



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 14 853 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/80
C 12 N 1/15
// C12N 9/02

DE 198 14 853 A 1

⑦1 Aktenzeichen: 198 14 853.4
⑦2 Anmeldetag: 2. 4. 98
④3 Offenlegungstag: 21. 10. 99

⑦1 Anmelder:
Consortium für elektrochemische Industrie GmbH,
81379 München, DE

⑦2 Erfinder:
Pfaller, Rubert, Dipl.-Chem. Dr., 80639 München,
DE; Hessing, Johanna, Dr., Delft, NL; Hondel,
Cornelis van den, Prof. Dr., Gouda, NL; Gorcom,
Robertus van, Dr., Soest, NL

⑤6 Entgegenhaltungen:
EP 05 70 096 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Expressionssystem zur Produktion von Proteinen

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Expressionssystem für die
Produktion eines Proteins in einem filamentösen Pilz be-
stehend aus

a) einem Wirtsorganismus aus der Klasse der Basidiomy-
ceten sowie

b) einem DNS-Vektor, der ein Selektionsmarkergen ent-
hält, welches für ein Protein kodiert, das nach Transfor-
mation eines filamentösen Pilzes aus der Klasse der Basi-
diomyceten eine Selektion positiver Transformanten er-
laubt und ausgewählt ist aus der Gruppe der Antibiotika-
resistenzgene, die für Proteine kodieren, die die wach-
stumshemmende Wirkung von Antibiotika aufheben, ge-
gen die der Wirtsorganismus nicht resistent ist, der Gene,
die Proteine kodieren, die zu einer farbgebenden Reaktion
befähigt sind und der Gene die einen genetischen Defekt
des Wirtsorganismus (Auxotrophie) komplementieren,
wobei die Expression des Selektionsmarkergens durch
mindestens ein in Basidiomyceten aktives genetisches
Regulationselement kontrolliert wird und

c) einem DNS-Vektor, der ein Gen enthält, welches für das
zu produzierende Protein kodiert, wobei die Expression
dieses Gens und ggf. auch die Sekretion des so produzier-
ten Proteins durch ein in Basidiomyceten aktives geneti-
sches Regulationselement kontrolliert wird, wobei
der DNS-Vektor, der ein Selektionsmarkergen enthält und
der DNS-Vektor, der das Gen, welches für das zu produzie-
rende Protein kodiert, auch als ein DNS-Vektor vorliegen
können.

DE 198 14 853 A 1

Die Erfindung betrifft ein Expressionssystem zur Produktion von Proteinen in filamentösen Pilzen der Unterklasse der Basidiomyceten, seine Herstellung und seine Verwendung.

Zur Proteinproduktion sind verschiedene prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme bekannt. Beispiele prokaryontischer Expressionssysteme sind *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*. Die Methoden zur gentechnischen Manipulation dieser Organismen sind wohl etabliert. Spezifische Nachteile dieser Expressionssysteme sind die oft enttauschend niedrige Produktionsrate vor allem eukaryontischer Proteine, die Faltung der produzierten Proteine derart, daß sie häufig nicht in aktiver Form vorliegen sowie vor allem, auch das Fehlen der posttranslationalen Modifikation der exprimierten Proteine. Als fehlende posttranslationale Modifikation seien beispielsweise der fehlende Einbau prosthetischer Gruppen oder die fehlende Glykosylierung des zu exprimierenden Proteins genannt.

Diese Nachteile prokaryontischer Expressionssysteme können durch Verwendung eukaryontischer Expressionssysteme umgangen werden.

Zu den verbreiteten eukaryontischen Expressionssystemen mit breiter Anwendung gehören Zellkultursysteme sowohl von Säugerzellen wie auch Insektenzellen sowie eukaryontische Mikroorganismen wie Hefen oder filamentöse Pilze. Während bei diesen Expressionssystemen das zu exprimierende Protein in der Regel in aktiver Form gebildet wird, ist die Produktionsrate vor allem bei der Expression heterologer Proteine in vielen Fällen zu niedrig. Als Beispiel hierfür kann die Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* oder in filamentösen Pilzen aus der Klasse der Ascomyceten dienen.

Hohe Produktionsraten in filamentösen Pilzen wie *Aspergillus* sind vor allem für die Expression homologer Proteine oder Proteine von filamentösen Pilzen der Klasse der Ascomyceten beschrieben. Die Expression heterologer Proteine gelingt oft nur mit geringer oder mäßiger Ausbeute. WO 96/00260 (z. B. beschreibt die heterologe Expression der Laccase LCC) aus dem filamentösen Pilz der Klasse der Basidiomyceten, *Polyporus pinus*. Bei der Expression in *Aspergillus*, einem filamentösen Pilz der Klasse der Ascomyceten, werden Ausbeuten bis zu 0,35 g/l in der Fermentation erzielt. Dies ist eine vergleichsweise geringe Ausbeutesteigerung im Vergleich zur Produktionsleistung von 0,1–0,2 g/l eines vergleichbaren Wildtypstammes in der Fermentation.

Speziell für Enzyme aus der Klasse der Basidiomyceten und hier vor allem der Weißfäulepilze besteht ein zunehmendes Interesse für industrielle Anwendungen. Als Beispiele seien genannt hydrolytische Enzyme wie Cellulasen, Cellulolasen oder Lipasen oder aber auch Oxidoreduktasen wie Ligninperoxidasen, Manganperoxidasen, Laccasen, Cellulose-Chinon-Oxidoreduktase oder Cellulose-Oxidase. Potentielle Anwendungen für diese Enzyme bestehen z. B. bei der Holz- bzw. Zellstoffverarbeitung.

Eine unter anderem in Basidiomyceten vorkommende Enzymklasse, die für industrielle Anwendungen von großem Interesse ist, ist die Enzymklasse der Laccasen (p-Hydroxyphenoloxidase, EC 1.10.3.2). Laccasen gehören zur Proteinfamilie der sogenannten blauen Kupferproteine und enthalten in der Regel vier Kupferionen, die in drei Typ 1 bis Typ 3 bezeichneten Kupferzentren angeordnet sind. Laccasen zeichnen sich weiter dadurch aus, daß es sich allgemein um sekretierte Proteine handelt und daß sie einen Glykosylierungsanteil von bis zu 10 bis 45% des Molekulargewichts enthalten können. Neben der Depolymerisierung von makromolekularen Verbindungen wie Lignin können Laccasen auch die Polymerisierung vor allem aromatischer Verbindungen katalysieren. Als Beispiel hierfür dient die Ligninbiosynthese in Pflanzen, bei der in Pflanzen vorkommende Laccasen beteiligt sind. Technische Anwendungsmöglichkeiten für Laccasen ergeben sich bei der Papierherstellung zur Delignifizierung von Zellstoff, bei Polymerisationsreaktionen aller Art, z. B. bei der Abwasserbehandlung. Die Verwendung von Laccasen ist auch in der organischen chemischen Synthese bekannt, z. B. bei Kopplungsreaktionen oder der Seitenkettenoxidation von Aromaten. Für die technische Anwendung bei allen diesen Verfahren ist jedoch Voraussetzung, daß das Laccasenzym kostengünstig und in größeren Mengen zur Verfügung gestellt werden kann.

Für verschiedene filamentöse Pilze aus der Klasse der Basidiomyceten wurden DNS-Vektoren beschrieben, die zur Transformation und Selektion von Transformanten geeignet sein sollen. Für den Basidiomyceten *Phanerochaete chrysosporium* wurde ein Verfahren zur homologen Transformation beschrieben (M. Alie et al. (1991) Curr. Genet. 19, 491–494). Für den Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* wurden DNS-Konstrukte für die Transformation beschrieben (K. Yanai et al. (1996) Biosci. Biotech. Biochem. 60, 472–475). US 5362640 beschreibt DNS-Vektoren für die Transformation des Basidiomyceten *Coriolus hirsutus*. Ebenso wird für die Transformation des Basidiomyceten *Coriolus versicolor* ein DNS-Vektor beschrieben (Y. Iimura et al. (1992) 5th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, 427–431). Von keinem dieser Expressionssysteme aus der Klasse der Basidiomyceten ist bekannt, daß eine signifikante Steigerung der Expressionsrate für homologe oder heterologe Proteine erreicht worden ist.

Bekannte Expressionsvektoren, die genetische Regulationselemente für die Expression in filamentösen Pilzen der Klasse der Ascomyceten enthalten, lassen sich nicht effizient in filamentösen Pilzen der Klasse der Basidiomyceten exprimieren. Sie erlauben daher bei Transformation filamentöser Pilze der Klasse der Basidiomyceten nicht die Selektion positiver Transformanten aufgrund z. B. erworbener Antibiotikaresistenz oder der Expression eines farbbegebenden Indikatorproteins oder aufgrund der Komplementation eines auxotrophen Gendefekts.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Expressionssystem für die Produktion eines Proteins in einem filamentösen Pilz bestehend aus

a) einem Wirtsorganismus aus der Klasse der Basidiomyceten sowie

b) einem DNS-Vektor, der ein Selektionsmarkergen enthält, welches für ein Protein kodiert das nach Transformation eines filamentösen Pilzes aus der Klasse der Basidiomyceten eine Selektion positiver Transformanten erlaubt und ausgewählt ist aus der Gruppe der Antibiotikaresistenzgene, die für Proteine kodieren, die die wachstumshemmende Wirkung von Antibiotika aufheben, gegen die der Wirtsorganismus nicht resistent ist, der Gene, die Proteine kodieren, die zu einer farbbegebenden Reaktion befähigt sind und der Gene die einen genetischen Defekt des Wirtsorganismus (Auxotrophie) komplementieren, wobei die Expression des Selektionsmarkergens durch mindestens ein

in Basidiomyceten aktives genetisches Regulationselement kontrolliert wird und

c) einem DNS Vektor der ein Gen enthält, welches für das zu produzierende Protein kodiert wobei die Expression dieses Gens und ggf. auch die Sekretion des so produzierten Proteins durch ein in Basidiomyceten aktives genetisches Regulationselement kontrolliert wird, wobei der DNS-Vektor, der ein Selektionsmarkergen enthält und der DNS-Vektor der das Gen welches für das zu produzierende Protein kodiert auch als ein DNS-Vektor vorliegen können.

Als Antibiotikaresistenzgene geeignet sind vorzugsweise Gene, die Resistenz verleihen gegen ein Antibiotikum aus der Gruppe Hygromycin, Bialaphos, Kanamycin, Geneticin, Bleomycin, Oligomycin, G418, Zeocin, Benomyl und Phleomycin.

Vorzugsweise können weiter Selektionsmarkergene verwendet werden, die für Proteine kodieren, die zu einer farbgebenden Reaktion befähigt sind, z. B. das Glucuronidasegen oder das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP).

Besonders geeignet sind Selektionsmarkergene, die einen genetischen Defekt des Wirtsorganismus (Auxotrophie) komplementieren können.

Für das erfindungsgemäße Expressionssystem bevorzugte Wirtsorganismen aus der Klasse der Basidiomyceten sind monokaryontische Basidiomyceten.

Besonders bevorzugt stammt der Wirtsorganismen aus der Gattung *Agaricus*, *Coriolus*, *Polyporus*, *Pleurotus*, *Phanerochaete*, *Schizophyllum* oder *Trametes*.

Insbesondere bevorzugt sind Wirtsorganismen der Art *Trametes versicolor*.

Der Wirtsorganismus im erfindungsgemäßen Expressionssystem zeichnet sich vorzugsweise dadurch aus, daß er aus der Klasse der Basidiomyceten stammt und einen genetischen Defekt im Stoffwechselmetabolismus (Auxotrophie) besitzt, aufgrund dessen einer oder mehrere für das Wachstum essentielle Stoffwechselmetaboliten nicht mehr synthetisiert werden können und der Wirtsorganismus auf Minimalmedien ohne Zusatz dieses oder dieser Stoffwechselmetaboliten nicht mehr zum Wachstum befähigt ist.

Die Erfindung betrifft daher auch ein Expressionssystem welches dadurch gekennzeichnet ist, daß der Wirtsorganismus aus der Klasse der Basidiomyceten einen genetischen Defekt im Stoffwechselmetabolismus (Auxotrophie) besitzt, aufgrund dessen einer oder mehrere für das Wachstum essentielle Stoffwechselmetaboliten nicht mehr synthetisiert werden können und der Wirtsorganismus auf Minimalmedien ohne Zusatz dieses oder dieser Stoffwechselmetaboliten nicht mehr zum Wachstum befähigt ist und das Selektionsmarkergen derart ausgewählt ist, daß es den auxotrophen Gendefekt des Wirtsorganismus komplementiert.

Beispiele für Selektionsmarkergene, die einen auxotrophen Gendefekt im Wirtsorganismus komplementieren können, sind das OOT-Gen (kodiert für das Gen der Ornithin-Carbamoyltransferase, US 5362640), das pyr G-Gen (kodiert für das Gen der Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase, Goosen et al., Curr. Genet. (1987) 11, 499-503), das urpC Gen (kodiert für ein Gen, dessen trifunktionales Genprodukt Enzymaktivität für Phosphoribosyl-Anthranylisomerase, Glutamin-Amidotransferase und Indol-Glycerinphosphatsynthase besitzt, Yellon et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 1470-1474), oder das nia D Gen (kodiert für das Nitratreduktase Gen).

Besonders bevorzugt als Selektionsmarkergen ist das pyr G Gen, das für die Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase (ein Enzym des Uridinstoffwechsels) kodiert, und die Uridin Auxotrophie eines im pyr G Gen defekten Wirtsstammes komplementieren kann. Als Wirtsorganismus besonders bevorzugt ist dabei ein Basidiomycetenstamm mit einem Defekt im pyr G Gen der für Uridin auxotroph ist.

Das pyr G Gen stammt bevorzugt aus einem Pilz aus der Klasse der Basidiomyceten, z. B. aus der Gattung *Agaricus*, *Oriolus*, *Polyporus*, *Pleurotus*, *Phanerochaete*, *Schizophyllum* oder *Trametes*.

Bevorzugt geeignet für die Expression des pyr G Gens sind die Promotor- und Terminatorelemente für ein Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenasegen (GAPDH Gen) beispielsweise aus den filamentösen Pilzen der Klasse der Basidiomyceten, *Schizophyllum commune*, *Agaricus bisporus* (das GAPDH Ag2 Gen), *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* oder für ein Laccase Gen, vorzugsweise das Laccase I Gen, bzw. das Laccase III Gen aus *Trametes versicolor*.

Insbesondere geeignet als Selektionsmarkergen für das erfindungsgemäße Expressionssystem sind das Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylasegen pyr G Gen vorzugsweise aus dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune* oder aus dem Basidiomyceten *Trametes versicolor*.

Vorzugsweise wird die Expression des pyr G Gens aus dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune* vom Promotor und ggf. Terminator für das pyr G Gen aus *Schizophyllum commune* reguliert.

Vorzugsweise wird die Expression des pyr G Gen aus dem Basidiomyceten *Trametes versicolor*, vom Promotor und Terminator für das pyr G Gen aus *Trametes versicolor* reguliert.

Das erfindungsgemäße Expressionssystem eignet sich insbesondere zur Expression eines Gens das für ein hydrolytisches Enzym z. B. aus der Gruppe der Cellulasen, Hemicellulasen und Lipasen oder aus der Gruppe der Oxidoreduktasen wie z. B. den Ligninperoxidasen, Manganperoxidasen, Laccasen, Cellobiose-Chinon-Oxidoreductase oder Cellobiose-Oxidase kodiert.

Insbesondere bevorzugt eignet es sich zur Expression eines Gens für eine Laccase.

Die Erfindung betrifft ferner einen DNS Vektor, der mindestens ein Selektionsmarkergen enthält, welches für ein Protein kodiert das nach Transformation eines filamentösen Pilzes aus der Klasse der Basidiomyceten eine Selektion positiver Transformanten erlaubt, dadurch gekennzeichnet, daß das Selektionsmarkergen ausgewählt ist aus der Gruppe der Antibiotikaresistenzgene, die für Proteine kodieren, die die wachstumshemmende Wirkung von Antibiotika aufheben, gegen die der Wirtsorganismus nicht resistent ist, der Gene, die Proteine kodieren, die zu einer farbgebenden Reaktion befähigt sind und der Gene die einen genetischen Defekt des Wirtsorganismus (Auxotrophie) komplementieren und daß das Selektionsmarkergen durch mindestens ein in Basidiomyceten aktives genetisches Regulationselement kontrolliert wird.

Die erfindungsgemäßen DNS-Vektoren erlauben die Selektion positiver Transformanten aufgrund Komplementation

eines auxotrophen Gendefekts im Wirtsorganismus bei Transformation filamentöser Pilze der Klasse der Basidiomyceten.

Insbesondere die Selektion von Transformanten des filamentösen Pilzes *Trametes versicolor* und in einer besonders bevorzugten Ausführung Transformanten von pyr G-defizienten, auxotrophen Stämmen von *Trametes versicolor* wird ermöglicht durch die als bevorzugt geeignet genannten Gene zur Komplementation auxotropher Gendefekte im Wirtsorganismus.

Die erfindungsgemäßen DNS-Vektoren eignen sich auch zur Expression von Genen die für Proteine kodieren in filamentösen Pilzen der Klasse der Basidiomyceten. Unter Genen die für Proteine kodieren sind im Sinne der Erfindung auch die von den Strukturgenen abgeleiteten cDNS-Gene der Proteine zu verstehen. Bei den Proteinen kann es sich um für Basidiomyceten heterologe Proteine oder um für Basidiomyceten homologe Proteine handeln.

Der erfindungsgemäße DNS-Vektor enthält somit vorzugsweise auch mindestens ein Gen das für ein zu exprimierendes Protein kodiert.

Besonders bevorzugt enthält der erfindungsgemäße DNS-Vektor mindestens ein Gen das für ein hydrolytisches Enzym z. B. aus der Gruppe der Cellulasen, Hemicellulasen und Lipasen oder aus der Gruppe der Oxidoreduktasen wie z. B. den Ligninperoxidasen, Manganperoxidasen, Laccasen, Cellulose- α -Chinon-Oxidoreduktase oder Cellulose-Oxidase kodiert.

Insbesondere bevorzugt enthält der erfindungsgemäße DNS-Vektor ein Gen für eine Laccase.

Ein für die Expression des proteinkodierenden Gens notwendiger Promotor kann von dem zu exprimierenden Gen stammen oder es kann auch der Promotor eines fremden Gens mit dem kodierenden Bereich des zu exprimierenden Gens funktionell verknüpft, verwendet werden.

Der erfindungsgemäße DNS-Vektor enthält somit vorzugsweise auch einen Promotor für die Expression des proteinkodierenden Gens.

Besonders bevorzugt enthält der erfindungsgemäße DNS-Vektor als Promotor für die Expression des proteinkodierenden Gens einen Promotor, der eine hohe Expressionsleistung gewährleistet.

Ein zu diesem Zweck bevorzugt verwendeter Promotor ist beispielsweise der Promotor des Gens für das Protein Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) beispielsweise aus der Gattung *Trametes versicolor*.

Der erfindungsgemäße DNS-Vektor enthält vorzugsweise auch einen Transkriptionsterminator für das proteinkodierende Gen.

Als Transkriptionsterminator kann der Terminator des zu exprimierenden proteinkodierenden Gens verwendet werden oder aber der Terminator eines fremden Gens. Bevorzugt wird der Transkriptionsterminator aus dem Gen einer Laccase.

Die Expression der Proteine kann intrazellulär oder in Gegenwart einer funktionstüchtigen Signalsequenz zum Zweck der Sekretion, auch extrazellulär erfolgen.

Falls die Sekretion des exprimierten Proteins aus der Zelle erwünscht ist, enthält der erfindungsgemäße DNS-Vektor vorzugsweise eine funktionstüchtige Signalsequenz 5' vor dem proteinkodierenden Gen. Darüberhinaus kann auch ein sogenannter Sekretionscarrier, funktionell mit dem 5'-Ende des proteinkodierenden Gens verknüpft, in dem erfindungsgemäßen DNS-Vektor enthalten sein.

Bei dem Sekretionscarrier kann es sich um das Gen für ein sekretiertes Protein oder um das Fragment eines Gens für ein sekretiertes Protein handeln. Der Sekretionscarrier kann mit dem zu sekretierenden Protein funktionell, so verknüpft sein, daß ein Fusionsprotein aus Sekretionscarrier und dem zu sekretierenden Protein entsteht. In einer anderen Ausführung ist die Verknüpfung von Sekretionscarrier und dem zu sekretierenden Protein so gestaltet, daß der Sekretionscarrier von dem zu sekretierenden Protein getrennt werden kann. Dies kann beispielsweise bewerkstelligt werden durch Einführung einer Erkennungssequenz für eine proteinspaltendes Enzym in die Verknüpfungsstelle zwischen Sekretionscarrier und zu sekretierendem Protein. Als Beispiel hierfür und sei genannt die Lysin-Arginin Erkennungssequenz für die sogenannte KEX2-Protease und als Beispiel für einen Sekretionscarrier die Glucoamylase aus *Aspergillus niger* (Contreras et al., Bio/Technology (1991) 9, 378-381; Broekhuijsen et al., J. of Biotechnology (1993) 31, 135-145).

DNS-Sequenzen, die anders als Transkriptionsterminatoren am 3'-Ende des proteinkodierenden Gens an der Expression und Sekretion des exprimierten Gens beteiligt sind, können ebenfalls in dem erfindungsgemäßen DNS-Vektor enthalten sein. Ein Beispiel dafür liefert das Gen für die Laccase aus *Neurospora crassa*, dessen 3'-Ende die Sequenz für 13 Aminosäuren enthält, die während der Sekretion des Proteins entfernt werden und im reifen Protein nicht mehr enthalten sind (Germann et al., J. Biol. Chem. (1988) 263, 885-896).

Die Herstellung der erfindungsgemäßen DNS-Vektoren erfolgt mittels im Stand der Technik bekannter Verfahren. Verschiedene Möglichkeiten sind in den Beispielen dargelegt. Die dort beschriebenen Verfahren lassen sich vom Fachmann auf beliebige andere Vektoren, Resistenzgene, Regulationselemente und Strukturgene anwenden.

Die erfindungsgemäßen DNS-Vektoren eignen sich zur Herstellung von Pilzstämmen, die zur effizienten Expression und Sekretion von Proteinen befähigt sind.

Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung von Pilzstämmen, die zur effizienten Expression und Sekretion von Proteinen befähigt sind.

Dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtsstamm ein filamentöser Pilz aus der Klasse der Basidiomyceten mit einem auxotrophen Gendefekt verwendet wird, welcher mittels an sich bekannter Verfahren mit einem DNS-Vektor der ein Gen zur Komplementation des auxotrophen Gendefekts im Wirtsstamm besitzt, transformiert wird und aus dem Transformationsansatz die mit dem DNS-Vektor transformierten Klone durch Selektion auf Komplementation des auxotrophen Gendefekts ausgewählt werden, wobei die Expression des Gens zur Komplementation des auxotrophen Gendefekts im Wirtsstamm durch ein genetisches Regulationselement kontrolliert wird, das in Basidiomyceten aktiv ist.

Filamentöse Pilze aus der Klasse der Basidiomyceten, die als Wirt für die Genexpression verwendet werden können, gehören zur Gattung *Phanerochaete*, *Agaricus*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Trametes*, *Coriolus* oder *Polyporus*.

Bevorzugt als Wirt für die Genexpression ist ein monokaryontischer Basidiomycet. Insbesondere bevorzugt ist ein Pilz aus der Gattung *Trametes*, *Coriolus* oder *Polyporus*.

Weiterhin ist es von Vorteil, wenn die genannten Wirtsstämme aus der Klasse der Basidiomyceten einen auxotrophen

Gendefekt haben, der als Selektionsmarker zur Identifizierung positiver Transformanten verwendet werden kann. Verwendet werden können beispielsweise Wirtsstämme aus der Klasse der Basidiomyceten, die einen Gendefekt im OCT-Gen, im pyr G-Gen, im trpC Gen oder im nia D Gen haben.

Bevorzugt als Wirt für die Genexpression ist ein Pilz aus der Klasse der Basidiomyceten, der einen Defekt im pyr G-Gen hat.

Insbesondere bevorzugt für die Genexpression ist ein Wirt der Art *Trametes versicolor*, der einen Defekt im pyr G-Gen hat und für Uridin auxotroph ist.

Die Transformation von filamentösen Pilzen aus der Klasse der Basidiomyceten erfolgt nach Methoden, die dem Stand der Technik entsprechen. Zu diesen Methoden gehören die Transformation von Protoplasten nach der CaCl_2/PEG -Methode, die Transformation durch Elektroporation oder die biolistische Transformation durch Beschuß mit DNS-haltigen Mikroprojektilen. Diese Verfahren sind in Standardlehrbüchern beschrieben.

Beispielsweise wird das zu transformierende Gen in bekannter Art und Weise in einen erfindungsgemäßen DNS-Vektor kloniert und mittels der genannten Methoden in einen filamentösen Pilz aus der Klasse der Basidiomyceten eingebracht.

Das zu transformierende Gen kann aber auch in einen Expressionsvektor ohne Selektionsmarkergen kloniert werden und zusammen mit einem den auxotrophen Gendefekt des Wirtstammes komplementierenden Vektor zur Erzeugung von Transformanten verwendet werden (Cotransformation).

Bevorzugter Stamm für die Transformation ist ein filamentöser Pilz aus der Klasse der Basidiomyceten und hier vor allem aus der Gattung *Trametes*, *Coriolus* oder *Polyporus*. Bei dem betreffenden Stamm aus der Klasse der Basidiomyceten kann es sich dabei um einen monokaryontischen oder aber auch um einen dikaryontischen Stamm handeln. In einer bevorzugten Ausführung handelt es sich um einen Uridin-auxotrophen Stamm, der einen Defekt im pyr G-Gen hat.

Besonders bevorzugt für die Transformation ist ein monokaryontischer, Uridin-auxotropher, pyr G defizienter Stamm aus der Art *Trametes versicolor*.

Die Selektion positiver Transformanten erfolgt beispielsweise, indem Protoplasten nach der Transformation mit Vektor DNS auf einem Medium ausgebracht werden, welchem zur osmotischen Stabilisierung der Protoplasten ein Zusatz wie z. B. Sorbitol, Mannitol oder Saccharose beigelegt ist und welches die Selektion von Transformanten mit dem komplementierenden pyr G-Gen erlaubt.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung wird in einem homologen System der filamentöse Pilz aus der Klasse der Basidiomyceten, *Trametes versicolor*, mit dem Gen einer Laccase aus *Trametes versicolor* transformiert. Dadurch wird eine Steigerung der Expressionsrate für die besagte Laccase erzielt, die die nach dem Stand der Technik erzielbare Produktionsrate in der Fermentation von 0,1 g Laccase/l Kulturmedium signifikant verbessert.

Vorzugsweise verwendet man dazu den Promotor der dem Laccasegen eigen ist oder den Promotor für ein stark exprimiertes Gen aus *Trametes versicolor*. Vorzugsweise verwendet man die Promotoren der Laccasegene I und III, deren Isolierung im 4. Beispiel beschrieben wird. Von dem Laccase I Gen wird dabei vorzugsweise der in SEQ ID NO: 1 enthaltene Sequenzabschnitt von Base 1-1192 verwendet. Von dem Laccase III Gen wird vorzugsweise der in SEQ ID NO: 2 enthaltene Sequenzabschnitt von Base 1-547 verwendet. Den Promotor eines weiteren stark exprimierten Gens stellt der GAPDH Promotor für die Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *Trametes versicolor* dar. Die Isolierung des GAPDH-Promotors wird im 5. Beispiel beschrieben. Die GAPDH-Promotorsequenz entspricht dem in SEQ ID NO: 3, Base 1-1542 aufgeführten Sequenzabschnitt. Es zeigte sich das insbesondere der in SEQ ID NO: 3, Base 1365 bis bp 1542 sowie zu diesem Sequenzabschnitt homologe Sequenzen mit einer Homologie größer als 73% für die Expression geeignet sind. Vorzugsweise ist ferner noch mindestens einer der folgenden Sequenzabschnitte ebenfalls auf dem erfindungsgemäßen Regulationselement vorhanden:

SEQ ID NO: 3: Base 1005 bis bp 1123 sowie zu diesem Sequenzabschnitt homologe Sequenzen mit einer Homologie größer als 52%, oder

SEQ ID NO: 3: Base 817 bis bp 947 sowie zu diesem Sequenzabschnitt homologe Sequenzen mit einer Homologie größer als 44%, oder

SEQ ID NO: 3: Base 640 bis bp 728 sowie zu diesem Sequenzabschnitt homologe Sequenzen mit einer Homologie größer als 50%.

In der vorliegenden Erfindung beziehen sich alle erwähnten Homologiewerte auf Ergebnisse, die mit dem Computerprogramm "Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin" erhalten werden. Die Homologiebestimmung erfolgt durch eine Suche in der Datenbank mit dem Unterprogramm "fasta" und den voreingestellten Werten (word size 6). Die ähnlichsten Sequenzen werden dann mit dem Unterprogramm "gap" auf Homologie untersucht. Hierbei werden die voreingestellten Parameter "gap creation penalty 50" und "gap extension penalty 3" verwendet. Zusätzlich wurde mit dem Unterprogramm "gap" und den oben genannten voreingestellten Parametern die in JP 09047289 offenbarte, aber noch nicht in einer Datenbank verfügbare Promotorsequenz des GAPDH-Gens aus *Coriolus hirsutus* auf Homologie untersucht.

Die Erfindung betrifft somit auch ein in Basidiomyceten aktives Regulationselement welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es den in SEQ ID NO: 1 enthaltenen Sequenzabschnitt von Base 1-1192 oder den in SEQ ID NO: 2 enthaltenen Sequenzabschnitt von Base 1-547 oder den in SEQ ID NO: 3, enthaltenen Sequenzabschnitt von Base 1365-1542 sowie zu diesem Sequenzabschnitt homologe Sequenzen mit einer Homologie größer als 73% umfaßt.

Vorzugsweise verwendet man Selektionsmedien, auf denen nur solche Transformanten von *Trametes versicolor* wachsen können, die mit einem funktionell exprimierten Selektionsmarkergen für das pyr G-Gen transformiert worden waren. Bevorzugt handelt es sich um ein in 2. Beispiel beschriebenes Minimalmedium in Abwesenheit von Uridin, auf dem pyr G auxotrophe Stämme von *Trametes versicolor* nicht mehr wachsen können, bzw. erst nach Zusatz von Uridin wieder wachsen können.

Die erfolgreiche Anwendung eines erfindungsgemäßen DNS-Vektors enthaltend das pyr G Gens als Selektionssystem ist abhängig von der effizienten Expression des Selektionsmarkergens in *Trametes* Transformanten. Für eine effiziente Expression sind entsprechende Expressionssignale notwendig.

In *Trametes versicolor* bewirken Expressionssignale aus Basidiomyceten mit überraschenderweise erheblich höherer Effizienz eine funktionelle Expression als die anderweitig verfügbaren Expressionssignale aus Ascomyceten. Deshalb stehen bei den erfindungsgemäßen DNS-Vektoren das pyr G-Gen Selektionsmarkergen vorzugsweise unter der Kontrolle von genetischen Regulationselementen aus Basidiomyceten.

Vorzugsweise steht das pyr G-Gen unter der Kontrolle der ihm vorgeschalteten 5'-Promoterregion sowie der ihm nachgeschalteten 3'-Terminatorregion. Ein DNS-Fragment, bei dem das pyr G-Gen aus *Schizophyllum commune* unter Kontrolle der Expressionssignale des pyr G-Gens aus *Schizophyllum commune* steht, ist von Troeliger et al., Gene (1989) 83, 387-393 beschrieben. Weiterhin kann das pyr G-Gen unter der Kontrolle von Expressionssignalen aus Basidiomyceten stehen, die verschieden von denen des pyr G-Gens sind. Zu den Expressionssignalen, die diese Funktion erfüllen, gehören GAPDH-Promotoren filamentöser Pilze aus der Klasse der Basidiomyceten, wie z. B. *Coriolus hirsutus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus bisporus* oder *Trametes versicolor*, der OCT-Promotor aus *Coriolus hirsutus*, der Promotor der Laccase I oder der Laccase III aus *Trametes versicolor* sowie der Terminator des GAPDH-Gens aus *Agaricus bisporus* oder die Terminatoren des Laccase I, bzw. Laccase III Gens aus *Trametes versicolor*.

Besonders bevorzugt ist ein Vektor, der im 3. Beispiel beschrieben wird, bei dem das pyr G-Gen aus *Schizophyllum commune* unter Kontrolle der Expressionssignale des pyr G-Gens aus *Schizophyllum commune* steht.

Das pyr G-Gen kann jedes Gen sein, das für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Orotidin-5'-Phosphat-decarboxylase kodiert. Bevorzugt stammt das pyr G-Gen aus einem filamentösen Pilz aus der Klasse der Basidiomyceten, wie z. B. *Agaricus bisporus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus hirsutus*, *Polyporus pinus*, *Schizophyllum commune* oder *Trametes versicolor*.

Besonders bevorzugt ist das pyr G-Gen aus *Schizophyllum commune* und *Trametes versicolor*.

Ferner betrifft die Erfindung Pilzstämme der Unterklasse der Basidiomyceten, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie einen erfindungsgemäßen DNS-Vektor enthalten.

Diese Pilzstämme sind zur effizienten Expression und Sekretion von Proteinen befähigt.

Insbesondere die filamentösen Pilze der Gattung *Trametes*, *Coriolus* und *Polyporus* zeigen eine stark erhöhte Expression und Sekretion von Proteinen.

Somit betrifft die Erfindung insbesondere auch filamentöse Pilze der Gattung *Trametes*, *Coriolus* und *Polyporus*, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie einen erfindungsgemäßen DNS-Vektor enthalten.

Bei den exprimierten und sekretierten Proteinen kann es sich um heterologe Proteine oder aber um homologe Proteine handeln.

Vorzugsweise handelt es sich um eine Laccase. Solche Laccasen sind beispielsweise aus dem Stamm *Trametes versicolor* bekannt (Beispiele für Laccasegene sind das Gen für Laccase I, SEQ ID NO. 1, Base 1193-3312, oder das Gen für Laccase III, SEQ ID NO. 2, Base 548-2542).

Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur Herstellung von Proteinen welches dadurch gekennzeichnet ist, daß das erfindungsgemäße Expressionssystem in an sich bekannter Weise zur Proteinproduktion eingesetzt wird oder daß ein Pilzstamm der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurde in an sich bekannter Art und Weise kultiviert wird.

Solche Herstellungsverfahren sind beispielsweise bekannt aus CA AN 96-203142, Eggert et al., Appl. Environ. Microbiol. (1996) 62, 1151-1158, Martinez et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. (1994) 41, 500-504, oder WO 93/08272.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Die in den Beispielen verwendeten Standardmethoden zur Behandlung von DNS oder RNS, wie die Behandlung mit Restriktionsendonukleasen, DNS Polymerasen, Reverse Transkriptase etc., sowie die Standardverfahren wie Transformation von Bakterien, Southern und Northern Analyse, DNS Sequenzierung, radioaktive Markierung, Screening und PCR-Technologie wurden, wenn nicht anders angegeben, durchgeführt wie vom Hersteller empfohlen oder wenn keine Herstelleranleitung vorhanden war entsprechend dem aus den Standardlehrbüchern bekannten Stand der Technik.

1. Beispiel

Herstellung von *Trametes* Protoplasten und Regenerierung von Pilzkolonien

Für die Gewinnung von Protoplasten verwendet wurden die dikaryotischen Stämme *Trametes versicolor* TV-1 (hinterlegt bei der DSMZ Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig unter der Nummer DSM 11523), *Trametes versicolor* 38070 (erhältlich von American Type Culture Collection, Rockville, MD 20852 USA) und der monokaryotische Stamm *Trametes versicolor* F2 100 (hinterlegt bei der DSMZ Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig unter der Nummer DSM 11972). Mycel von *Trametes versicolor* wurde zuerst durch Anzucht für 7 Tage bei 28°C auf Malzagarplatten (3% Malz Extrakt, 0,3% Pepton aus Sojabohnenmehl, 1,5% Agar-Agar, pH 5,0) gewonnen. Von den Malzagarplatten wurden drei Stücke ausgestanzt und damit 100 ml steriles 1,5% Malzextrakt Medium (3% Malz Extrakt, 0,3% Pepton aus Sojabohnenmehl, pH 5,0) in 500 ml Erlenmeyerkolben, bzw. 125 ml des sterilen Mediums in 162 cm² Zellkulturgefäßen, angeimpft. Die Kultur wurde ohne Schütteln für 7 Tage bei 28°C inkubiert, bis die Kulturflüssigkeit dicht mit einer Mycelmatte bewachsen war. Die Kulturflüssigkeit wurde abdekantiert und Insches Medium zugegeben (30 ml für das Mycel einer 100 ml Anzucht). Das Mycel wurde mit einem Ultra Turrax (9500 rpm, 4 min) homogenisiert und unter Schütteln bei 100 rpm für weitere 18 h bei 28°C inkubiert.

Die auf diese Weise hergestellte Mycelsuspension wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm (2000×g) getrennt und das dabei erhaltene Mycel dreimal durch suspendieren mit 0,1 M MgSO₄, 0,6 M Saccharose, 0,1 M Phosphat, pH 5,8 (OMT-Medium) und anschließende Zentrifugieren gewaschen. Das isolierte Mycel wurde gewogen und bis zur Behandlung mit lytischem Enzym bei 4°C aufbewahrt.

Protoplasten wurden folgendermaßen hergestellt: In einem sterilen Erlenmeyerkolben wurde Mycelium eines Kolbens in 15 ml einer frisch hergestellten und sterilfiltrierten Lösung des lytischen Enzymgemisches Novozym 234 (3 mg/ml,

Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark) in OMT-Medium suspendiert. Das in der Enzymlösung resuspendierte Mycelium wurde bei geringer Drehzahl (80 rpm) auf einem Schüttelinkubator (Intors) für 1 bis 3 h bei 30°C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Bildung der Protoplasten im Mikroskop beobachtet. Frei bewegliche Protoplasten waren üblicherweise nach 1 h zu sehen. Der Endpunkt der Protoplastierung wurde durch visuelle Inspektion im Mikroskop bestimmt und die Protoplasten durch Filtration über Glaswolle in einem Glasfilter von restlichem Mycelium abgetrennt. Die Glaswolle wurde sorgfältig mit eiskühlem OMT-Medium gewaschen. Protoplasten wurden durch Zentrifugation der Suspension in einem sterilen Probengefäß isoliert (2000 rpm; 2500xg, 4°C, 10 min). Die weitere Bearbeitung der Zellen erfolgte bei 4°C. Das Protoplastenpellet wurde durch suspendieren in OMT-Medium gewaschen und durch Zentrifugation reisoliert. Bei Bedarf wurde der Waschschritt wiederholt. Die Konzentration von Protoplasten wurde unter dem Mikroskop in einer Zählkammer bestimmt. Die Protoplastensuspension wurde für Experimente zur Protoplastenregenerierung oder für Transformationen auf eine Konzentration von 1×10^6 Protoplasten/ml eingestellt.

Für Regenerierungsexperimente wurden von der Protoplastensuspension Verdünnungsreihen hergestellt und auf Agarplatten ausplattiert, die 1.5% Malzextrakt, 0.1% Trypticase Pepton, 2% Glucose, 1.5% Agar und zur osmotischen Stabilisierung 0.4 M Mannitol enthielten. Auf diese Weise wurde der Anteil an überlebensfähigen Zellen bestimmt und getestet, ob die erhaltenen Protoplasten zu mycelartigem Wachstum regeneriert werden konnten. Auf die gleiche Weise wurde auf osmotisch nicht stabilisierten Platten (ohne Mannitol) der Anteil an osmotisch stabilen Zellen (z. B. Mycelfragmente) bestimmt. Nach Inkubation bei 28°C für 7 Tage wurden die erhaltenen Kolonien gezählt. Der Anteil überlebensfähiger Zellen aus einer Reihe von Protoplastenpräparationen betrug ca. 0.5%. Diese Ergebnisse zeigen, daß von *Trametes versicolor* überlebensfähige und regenerierbare Protoplasten für Transformationsexperimente hergestellt werden können.

2. Beispiel

Isolierung von pyr G-defizierten Mutanten von *Trametes versicolor*

Auxotrophe Mutanten von *Trametes versicolor* mit einem Gendefekt im Pyrimidin Stoffwechsel (pyr-Mutanten) wurden in Anlehnung des in Boeke et al., *Methods Enzymol.* (1987) 154, 164-175 beschriebenen Verfahrens isoliert. Als selektives Agens wurde die genotoxische Substanz 5-Fluor-Orotinsäure (FOA) verwendet. Mutagenese von *Trametes versicolor* Protoplasten erfolgte durch UV-Behandlung.

A: UV-Mutagenese

Für die Mutagenese verwendet wurde der im 1. Beispiel beschriebene monokaryontische Stamm *Trametes versicolor* T2 100. Protoplasten dieses Stammes wurden hergestellt wie im 1. Beispiel beschrieben.

Für die Mutagenese wurde ein BioRad UV-Linker (5.8 W/cm², Abstand von der UV-Quelle 16 cm) verwendet. Die Zahl der für die Mutagenese verwendeten Protoplasten betrug 8×10^7 . Protoplasten von *Trametes versicolor* wurden in einer Petrieschale vorgelegt und für verschiedene lange Zeitabschnitte mit UV-Licht bestrahlt. Dabei stellte sich heraus, daß unter den beschriebenen Bedingungen eine Bestrahlung für 60 sec optimal für die nachfolgende Selektion auxotropher Mutanten war.

B: Selektion von Uridin auxotrophen Mutanten

Für die Selektion von Uridin auxotrophen Mutanten wurde folgendes Minimalmedium (MM) verwendet:

| | |
|---------------------------|-----------|
| Glucose | 20 g/l |
| Agar | 15 g/l |
| Kaliumdihydrogenphosphat | 1 g/l |
| Magnesiumsulfat | 0.5 g/l |
| Dinatriumhydrogenphosphat | 0.1 g/l |
| Adenin | 27.5 mg/l |
| DL- Phenylalanin | 0.15 g/l |
| L-Asparagin | 2.5 g/l |
| Thiamin | 0.48 mg/l |
| Calciumchlorid | 10 mg/l |
| Eisensulfat | 10 mg/l |
| Kupfersulfat | 2 mg/l |
| Zinksulfat | 1 mg/l |
| Mangansulfat | 1 mg/l |

pH 5.0, mit Schwefelsäure eingestellt

Für die osmotische Stabilisierung von Protoplasten wurde das MM-Medium mit 0.6 M Saccharose supplementiert (MMS-Medium). Für Flüssiganzuchten wurde das MM-Medium ohne Agar hergestellt.

Zu Beginn wurde das MMS-Medium mit verschiedenen Konzentrationen FOA sowie 10 mM Uridin supplementiert, um die Wachstumseigenschaften auf selektivem Medium für verschiedene *Trametes*-stämme zu charakterisieren. Es stellte sich heraus, daß MMS-Medium mit 1.5 mg/ml FOA und 10 mM Uridin (selektives MMS) das Wachstum der untersuchten *Trametes*-stämme vollständig unterdrückte.

Platten mit selektivem MMS wurden mit UV-mutagenisierten Protoplasten (in Abschnitt A beschrieben) beimpft und

DE 198 14 853 A 1

21 Tage bei 28°C inkubiert. Im Gegensatz zu nicht mutagenisierten Protoplasten wurde das Wachstum von 35 Kolonien beobachtet. Diese potentiellen pyr-defizienten Mutanten wurden, um den Uridin auxotrophen Phänotyp näher zu charakterisieren, auf MM-Platten, MM-Platten mit 10 mM Uridin und selektiven MM-Platten ausgebracht und das Wachstum zum Ausgangsstamm F2 100 verglichen. Dabei zeigten von den 35 gepickten Kolonien drei Trametesmutanten eindeutig einen pyr-defizienten Phänotyp. Dies ist in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Wachstum von Trametes versicolor Mutanten auf verschiedenen MM-Medien

| Stamm | MM | MM + 10 mM Uridin | MM + 10 mM Uridin + 1,5 mg/ml FOA |
|-----------|----|-------------------|-----------------------------------|
| F2 100 | + | - | - |
| F2 100B11 | - | - | - |
| F2 100B14 | - | + | + |
| F2 100B16 | - | + | - |

C. Identifizierung von pyr G-Mutanten.

Die Mutagenese mit FOA kann entweder zu Mutanten im pyr E Gen (Orotid-Phosphoribosyltransferase) oder im gewünschten pyr G Gen (Orotidin-5-Phosphatcarboxylase) führen. pyr G-Mutanten und pyr E-Mutanten wurden differenziert durch Transformation mit dem pyr G-Gen aus Schizophyllum commune (Plasmid pSCpyrG siehe 3. Beispiel).

Von den drei in Tabelle 1 aufgeführten pyr-defizienten Mutanten konnten nach Transformation mit dem Plasmid pSCpyrG Kolonien auf MM-Medium beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, daß alle drei Mutanten defizient im pyr G-Gen waren. Der pyr G-defiziente Trametes versicolor Stamm F2 100B11 ließ sich jedoch mit einer ca. 10fach höheren Häufigkeit transformieren, so daß dieser Stamm für die weiteren Untersuchungen verwendet wurde.

Bei den Stämmen Trametes versicolor F2 100B11, F2 100B14 und F2 100B16 handelt es sich um die ersten bisher beschriebenen pyr G-defizienten Stämme von Trametes versicolor. Diese pyr G-defizienten Stämme können als Wirtsorganismen dienen für die bisher nicht beschriebene Transformation von Trametes versicolor und sind somit neue wertvolle Wirtsorganismen für die Proteinexpression und Proteinsekretion in filamentösen Pilzen aus der Klasse der Basidiomyceten. Die Verwendung des Stammes F2 100B11 zu diesem Zweck wird in den folgenden Beispielen beschrieben.

3. Beispiel

Transformation von pyr G auxotrophen Trametes versicolor Stämmen mit dem pyr G-Gen aus Schizophyllum commune

A. Isolierung des pyr G-Gens aus Schizophyllum commune

Die Isolierung und DNS-Sequenz des pyr G-Gens aus Schizophyllum commune (in der Publikation bezeichnet als URA1 Gen) ist beschrieben in Froeliger et al., Gene (1989) 83, 387-393. Mycelium von Schizophyllum commune (Stamm ATCC 44201, bezogen von der ATCC American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776, USA) wurde in Malzextraktmedium hergestellt wie im 1. Beispiel für Trametes versicolor beschrieben. Die Isolierung von chromosomaler DNS folgte ebenfalls der Methode für Trametes versicolor und wird im 4. Beispiel beschrieben. Das pyr G-Gen wurde aus chromosomaler DNS von Schizophyllum commune durch PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primer A und B verwendet (abgeleitet von der publizierten Sequenz in Froeliger et al., Gene (1989) 83, 387-393), mit denen neben dem kodierenden Bereich auch Promotor- und Terminatorsequenzen amplifiziert werden konnten.

Primer A: 5'-TCCAGCTCGACCTTGCGCCGC-3' SEQ ID NO: 4

Primer B: 5'-GGATCCGACGTGGAGGAGCCG-3' SEQ ID NO: 5

PCR-Amplifikationen wurden entsprechend dem Stand der Technik nach den Angaben des Herstellers (PCR Kit von Stratagene) durchgeführt. Es wurden 200 ng chromosomaler S. commune DNS in einer 100 µl PCR Reaktion eingesetzt, die den vom Hersteller bereitgestellten Puffer enthielt und darüberhinaus 1,25 U Pfu Polymerase, je 0,2 mM der vier dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und jeweils 100 pmol der Primer A und B. Die weiteren Bedingungen zur spezifischen Amplifikation des gewünschten PCR-Produkts waren: 5 min bei 94°C, gefolgt von 25 Zyklen von 1 min bei 94°C, 1,5 min bei 50°C und 2,5 min bei 72°C sowie abschließend 5 min bei 72°C. Das gewünschte PCR-Produkt von ca. 1,6 kb Größe wurde durch Agarose Gelelektrophorese gereinigt und in den PCR-Script SK(+) Vektor (Stratagene) kloniert und E. coli transformiert. Aus der Anzucht transformierter E. coli wurde das Plasmid isoliert. Von einem positiven Klon

wurde durch DNS-Sequenzanalyse des Inserts bestätigt, daß das *S. commune* pyr G Gen amplifiziert worden war. Das Plasmid mit dem *S. commune* pyr G Gen wurde pSCpyrG (Fig. 1) bezeichnet.

B. Transformation von *Trametes versicolor* pyr G defizienten Stämmen

Protoplasten von *T. versicolor* F2 100B11 (siehe 2. Beispiel) wurden nach dem im 1. Beispiel beschriebenen Verfahren hergestellt. Dabei war das Anzuchtmedium für den auxotrophen Stamm mit 10 mM Uridin supplementiert worden. Es wurde mit dem Vektor pSCpyrG (beschrieben in Abschnitt A) transformiert.

Wie im 1. Beispiel beschrieben, wurden Protoplasten von *Trametes versicolor* F2 100B11 hergestellt und in einer Endkonzentration von 10^8 /ml suspendiert. In Inkubationsgefäßen von 12 ml Volumen wurden 0,1 ml Aliquots der Protoplasten mit je 10 µg DNS des Plasmids gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde langsam und unter wiederholtem Mischen 1,25 ml einer PEG4000 Lösung zum Transformationsansatz gegeben. Nach weiteren 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsgefäße mit dem im 1. Beispiel beschriebenen OMT-Medium aufgefüllt, gemischt und 10 min bei 4°C bei 2000×g zentrifugiert. Die Pellets wurden resuspendiert und auf osmotisch stabilisierten MMS-Platten ohne Uridin (beschrieben im 2. Beispiel) ausplattiert. Die Platten wurden bei 28°C für 14 Tage inkubiert und auf Wachstum von Kolonien überprüft. Bei verschiedenen Experimenten wurden Transformationsraten von 0,1-3 Transformanten/µg Plasmid DNS erzielt.

C. Reinigung der Transformanten

Mycel der erhaltenen Transformanten wurde gepickt und durch Ausplattieren auf frische Platten mit MM-Medium gereinigt. Dabei wurde das Inokulum punktförmig in der Mitte der Platte aufgebracht. Nach Inkubation für 7 bis 14 Tagen bei 28°C konnte radiales Mycelwachstum beobachtet werden. Dieser Reinigungsvorgang wurde wiederholt, wobei das Mycel für das Inokulum vom Rand der ersten Reinigungsplatte entnommen wurde. MM-Platten wurden dann erneut mit Inokulum der zweiten Reinigungsplatte inokuliert und bei 28°C inkubiert, bis die Platten vollständig mit Mycel bewachsen waren.

D. Analyse der Transformanten

Transformanten von *Trametes versicolor* mittels Southernblot Analyse auf die Integration des Plasmids pSCpyrG untersucht. Dazu wurde von verschiedenen Transformanten und als Kontrolle dem pyr G defizienten Stamm F2 100B11 Zellmycel in Flüssigkultur hergestellt (siehe 1. Beispiel, Malzextraktmedium, mit 10 mM Uridin versetzt). Von dem isolierten Mycel wurde chromosomale DNS isoliert wie nachfolgend im 4. Beispiel für beschrieben.

Von den untersuchten Stämmen wurden je 1 µg der chromosomalen DNS und 100 ng des Plasmids pSCpyrG durch einen Doppelverdau mit Not I und Eco RI geschnitten, anschließend durch Agarose Gelelektrophorese getrennt, auf Nylonfilter (Qiagen) gebロットet und mit einer radioaktiv markierter DNS-Sonde hybridisiert, die spezifisch für das pyr G Gen aus *Schizophyllum commune* war.

Die DNS-Sonde wurde vorbereitet, indem das Plasmid pSCpyrG durch einen Doppelverdau mit Not I und Eco RI geschnitten und das dabei entstandene 1,4 kb lange DNS-Fragment des pyr G Gens durch präparative Gelelektrophorese isoliert wurde. Das 1,6 kb lange pyr G-spezifische DNS-Fragment wurde mit α -[32 P]-dATP radioaktiv markiert ("Random Priming" Kit, Boehringer Mannheim). Freie Radioaktivität wurde durch Chromatographie über Sephadex G25 (Pharmacia) abgetrennt. Die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten DNS-Sonde betrug 1×10^6 cpm/µg DNS. Die Hybridisierungstemperatur für die auf Nylonfilter geblossene DNS mit der radioaktiv markierten DNS-Sonde betrug 60°C. Ansonsten wurden die in der Fachliteratur beschriebenen Bedingungen für Southernblots eingehalten. Southernblots wurden durch Autoradiographie ausgewertet. Dabei konnte das 1,6 kb lange pyr G-spezifische DNS-Fragment nur in den Transformanten, nicht jedoch in dem Uridin-auxotrophen Stamm F2 100B11 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt, daß bei der Transformation des Uridin-auxotrophen Stammes *Trametes versicolor* F2 100B11 das Plasmid pSCpyrG in das Genom integriert worden war und zur produktiven Expression des Selektionsmarkergens pyr G führte, wodurch die Uridin Auxotrophie dieses Stammes komplementiert wurde. Überraschenderweise wurde dabei auch erstmals festgestellt, daß die Expressionssignale des pyr G Gens aus dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune* auch in *Trametes versicolor* funktionstüchtig sind.

4. Beispiel

Klonierung von *T. versicolor* Laccase Genen

A: Herstellung einer chromosomalen Genbank auf *Trametes versicolor*

Genomische DNS von *T. versicolor* wurde aus dem Mycel einer Schüttelkolbenkultur isoliert. 1 g Mycel von *T. versicolor* wurden in Gegenwart von flüssigem Stickstoff mit Mörtel und Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Pulver wurde in einem sterilen Probengefäß aufgenommen und sofort mit 5 ml Extraktionslösung (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA, 0,25 M NaCl, 0,6 mg/ml Proteinase K) und 0,5 ml einer 10% (w/v) Natriumlaurylsarcosinlösung versetzt. Nach Incubation bei 50°C für mindestens 2 h wird das Gemisch mit 0,85 ml 5 M NaCl und 0,7 ml einer 10% (w/v) CTAB-Lösung in 0,7 M NaCl versetzt und 30 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 7 ml eines Chloroform-Isoamylalkoholgemisches (24 : 1) wird der Ansatz geschüttelt und die beiden Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die wässrige Phase wird entfernt und chromosomale DNS durch Zugabe von 0,6 Volumenanteilen Isopropanol gefällt. Die gefällte DNS wird anschließend über eine Säule (Qiagen Genomic Tip) gereinigt. Auf diese Weise konnten aus 16 g Mycel 0,5 mg chromosomale DNS isoliert werden.

DE 198 14 853 A 1

Zur Herstellung der chromosomalen Genbank wurden 90 µg chromosomale DNS von *Trametes versicolor* TV-1 in einem Partialverdau mit *Sac* 3A geschnitten und durch Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt. Die chromosomalen DNS-Fragmente wurden im Größenbereich von 5-20 kb und größer 20 kb isoliert und jeweils in mit *Bam* HI vorgeschchnittene *λ*-ambis-Phagen kloniert (Stratagene Klonierungssystem). Von der 5-20 kb DNS-Fraktion wurden 4×10^7 Phagen/µg Vektor-DNS und von der DNS-Fraktion größer 20 kb wurden 5×10^7 Phagen/µg Vektor-DNS erhalten. Die Phagen wurden durch Infektion des *E. coli* Stammes XL-1 Blue MRF⁺ amplifiziert.

B. Isolierung einer Laccase-spezifischen DNA Sonde

Eine DNS-Sonde zur Isolierung von Laccasegenen wurde durch PCR-Amplifikation aus *T. versicolor* genomischer DNS mit degenerierten Primern erzeugt. Die degenerierten Primer wurden anhand eines Sequenzvergleichs bekannter Laccasegene konstruiert. Es wurden die Aminosäuresequenzen der in der EMBL Gendatenbank enthaltenen Laccasegene von *Neurospora crassa*, *Coniolum hirsutum*, *Phlebia radiata*, *Agaricus bisporus* und eines nicht näher charakterisierten filamentösen Pilzes aus der Unterklasse der Basidiomyceten verglichen. Durch den Sequenzvergleich konnten vier Peptide mit einer Länge von 5 bis 7 Aminosäuren identifiziert werden, die in allen Laccasen vollständig konserviert waren. Unter Berücksichtigung degenerierter Codons wurden diese Peptide in DNS zurück übersetzt, um degenerierte Primer herzustellen. Die Primer hatten die folgenden Sequenzen:

| | | |
|-----------|---------------------------------------|--------------|
| Primer C: | 5'-TGGCAYGGNTTYTTYCA-3' | SEQ ID NO: 6 |
| Primer D: | 5'-TODATRTGRCARTG-3' | SEQ ID NO: 7 |
| Primer E: | 5'-ATTGAGGGATTCCTGGTAYCAYWSNCAY-3' | SEQ ID NO: 8 |
| Primer F: | 5'-ATACGAGGATTCCTGNCCTGNCCTGNARRTG-3' | SEQ ID NO: 9 |

Primer E und F enthielten im 5'-Bereich eine *Bam* HI Schnittstelle (unterstrichen) und daran angeschlossen jeweils die entsprechende degenerierte Laccasesequenz.

PCR-Amplifikationen wurden entsprechend dem Stand der Technik nach den Angaben des Herstellers (PCR Kit von Perkin Elmer) durchgeführt. In einer ersten PCR Reaktion wurden 200 ng chromosomaler *T. versicolor* DNS in einer 100 µl PCR Reaktion eingesetzt, die den von Hersteller bereitgestellten Puffer enthielt und darüberhinaus 1,25 U Taq Polymerase, 1,25 mM MgCl₂, je 0,2 mM der vier dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und jeweils 100 pmol der Primer C und D. Die weiteren Bedingungen zur spezifischen Amplifikation des gewünschten PCR-Produkts waren: 5 min bei 94°C, gefolgt von 7 Zyklen von 0,5 min bei 94°C, 1 min bei 40°C und 2,5 min bei 60°C sowie 30 Zyklen von 0,5 min bei 94°C, 1 min bei 50°C und 2,5 min bei 72°C. 1 µl der ersten PCR-Reaktion wurden in einer zweiten PCR-Reaktion eingesetzt, die darüberhinaus 1,25 U Taq Polymerase, 1,25 mM MgCl₂, je 0,2 mM der vier dNTPs und jeweils 100 pmol der Primer E und F enthielt. Die weiteren Bedingungen zur spezifischen Amplifikation des gewünschten PCR-Produkts waren: 5 min bei 94°C, gefolgt von 7 Zyklen von 0,5 min bei 94°C, 1 min bei 40°C und 2,5 min bei 60°C sowie 30 Zyklen von 0,5 min bei 94°C, 1 min bei 50°C und 2,5 min bei 72°C. Es wurde ein PCR-Produkt von ca. 1,1 kb erhalten. Das PCR-Produkt wurde durch Agarose Gelelektrophorese gereinigt, mit dem Restriktionsenzym *Bam* HI geschnitten und in einen mit *Bam* HI geschnittenen pUC18 Vektor kloniert und *E. coli* transformiert. Aus der Anzucht transformierter *E. coli* wurde das Plasmid isoliert. DNS-Sequenzanalyse vom 5'- und 3'-Ende bestätigte, daß es sich bei den klonierten DNS-Fragment um das Fragment eines Laccasegens handelte.

Zur Vorbereitung der DNS-Sonde für das Screening von Laccasegenen wurde das Laccase-spezifische PCR-Fragment durch Behandlung mit *Bam* HI ausgeschnitten, über Agarose Elektrophorese isoliert und mit α-[32]P-dATP radioaktiv markiert ("Random Priming" Kit, Boehringer Mannheim). Freie Radioaktivität wurde durch Chromatographie über Sephadex G25 (Pharmacia) abgetrennt. Die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten DNS-Sonde betrug 1×10^6 cpm/µg DNS.

C. Isolierung chromosomaler Laccasegene

Es wurde die im Abschnitt A beschriebene chromosomale Genbank von *Trametes versicolor* TV-1 verwendet. Das Screening nach genomischen Laccase Genen wurde nach dem Stand der Technik durchgeführt. In einer ersten Screeningrunde wurden Zellen von *E. coli* XL-1 Blue MRF⁺ auf 10 Petriesschalen zuerst kultiviert und dann mit 50000 Phagen der chromosomalen Genbank (5-20 kb Fraktion, siehe 4. Beispiel) pro Petriesschale infiziert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die neu gebildeten Phagen auf Nylonfilter (Stratagene) transferiert. Die Filter wurden dann entsprechend den Empfehlungen des Herstellers mit der radioaktiv markierten Laccase-spezifischen Sonde (siehe Abschnitt B) hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur betrug 45°C in einem Hybridisierungspuffer mit 50% Formamidgehalt. Positive Klone wurden gepickt und durch Wiederholung des Screeningverfahrens gereinigt. Nach drei Runden der Vereinzelung wurden bei dem Screening 20 stark hybridisierende Phagenklone isoliert, die nach einer Vorschrift des Herstellers (Stratagene) durch "in vivo excision" in den pBK CMV Vektor (Stratagene) umklont wurden. Analyse der Klone durch Verdau mit Restriktionsendonucleasen und DNS-Sequenzierung ergab, daß es sich bei 15 der 20 Klone um Laccaseklone handelte. Es wurden zwei verschiedene Laccaseklone erhalten. Die beiden Laccasegene erhielten die Bezeichnung Laccase I und Laccase III. Die Plasmide mit den beiden Laccasegenen wurden als pLac100 (SEQ ID No: 1) und pLac300 (SEQ ID No: 2) bezeichnet. Beide Laccasegene enthielten neben der Sequenzinformation für das Strukturgen (kodierender Bereich) auch Sequenzinformation in der Region 5' vor dem ATG-Startkodon (Promotorbereich) sowie Sequenzinformation in der Region 3' nach dem Stopkodon (Terminatorbereich). Es handelt sich hierbei um neue geneische Regulationselemente für *Trametes versicolor*, die für die Herstellung von DNS-Vektoren zur Genexpression in filamentösen Pilzen aus der Klasse der Basidiomyceten verwendet werden können. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die entspre-

DE 198 14 853 A 1

chenden Sequenzbereiche in SEQ ID No: 1 (Laccase I Gen) und SEQ ID No: 2 (Laccase III Gen).

Tabelle 2

| Genetische Elemente in SEQ ID No: 1 und SEQ ID No: 2 | | | 5 |
|--|----------------|-----------------|----|
| | SEQ ID No: 1 | SEQ ID No: 2 | |
| | Laccase I Gen | Laccase III Gen | |
| Promotor | bp 1 - 1192 | bp 1 - 547 | 10 |
| Strukturgen (mit Introns) | bp 1193 - 3312 | bp 548 - 2542 | |
| Terminator | bp 3313 - 7986 | bp 2542 - 5762 | 15 |

5. Beispiel

Klonierung des *T. versicolor* GAPDH-Gens

A. Isolierung einer GAPDM DNS-Sonde auf *Trametes versicolor*

Es wurde der Stamm *Trametes versicolor* TV-1 (siehe 1. Beispiel) verwendet. Anzucht von TV-1 und Isolierung von 25
chromosomaler DNS erfolgte wie im 1. Beispiel, bzw. 4. Beispiel beschrieben.

Anhand der publizierten DNS-Sequenzen des GAPDH-Gens aus *Phanerochaete chrysosporium* (M. C. Harnisen et al. 30
(1992), Curr. Genet. 22, 447-454) und des GAPDH-Gens aus *Coriolus hirsutus* (JP 9-47289) wurden Primer zur PCR-Amplifikation eines GAPDH-spezifischen Genfragments konstruiert. Die Primer hatten die folgenden DNS-Sequenzen:

Primer G: 5'- CGTATCGGCCGTCGTCCTCCG -3' (SEQ ID NO: 10) 35

Primer H: 5'- CGCCCTTCAAGTGGGCAGAGGCC -3' (SEQ ID NO: 11) 40

PCR-Amplifikationen wurden entsprechend dem Stand der Technik durchgeführt: In einer PCR Reaktion wurden 45
200 ng chromosomaler *Trametes versicolor* DNS in einer 100 µl PCR Reaktion eingesetzt, die den vom Hersteller bereitgestellten Puffer enthielt und darüberhinaus 1,25 U Taq Polymerase, 1,25 mM MgCl₂, je 0,2 mM der vier dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und jeweils 100 pmol der Primer G und H. Die weiteren Bedingungen zur spezifischen Amplifikation des gewünschten PCR-Produkts waren: 5 min bei 94°C, gefolgt von 7 Zyklen von 0,5 min bei 94°C, 1 min bei 47°C und 1 min bei 72°C sowie 30 Zyklen von 0,5 min bei 94°C, 1 min bei 50°C und 1 min bei 72°C. Es wurde ein PCR-Pro- 40
dukt von ca. 0,43 kb erhalten.

Das PCR-Produkt wurde durch Agarose Gelelektrophorese gereinigt, in den Vektor PCR-Script SK(+)[®] (Stratagene) 45
kloniert und *E. coli* transformiert. Aus der Anzucht transformierter *E. coli* wurde das Plasmid isoliert. DNS-Sequenzanalyse vom 5'- und 3'-Ende bestätigte, daß es sich bei dem klonierten DNS-Fragment um das Fragment des *P. chrysosporium* GAPDH-Gens handelte. Zur Vorbereitung der DNS-Sonde für das Screening von Laccasegenen wurde das Lac- 45
case-spezifische PCR-Fragment durch Behandlung mit Not I und Eco RI ausgeschnitten, über Agarose Elektrophorese isoliert und mit α-[32]P-dATP radioaktiv markiert ("Random Priming" Kit, Boehringer Mannheim). Freie Radioaktivität wurde durch Chromatographie über Sephadex G25 (Pharmacia) abgetrennt. Die spezifische Aktivität der radioaktiv mar- 50
kierten DNS-Sonde betrug 1×10⁷ cpm/µg DNS.

B: Isolierung eines chromosomalen GAPDM-Gens aus *T. versicolor*

Es wurde die im Abschnitt A des 4. Beispiels beschriebene chromosomale Genbank von *Trametes versicolor* TV-1 55
verwendet. Das Screening nach dem chromosomalen GAPDH-Gen wurde nach dem Stand der Technik durchgeführt. In einer ersten Screeningrunde wurden Zellen von *E. coli* XL-1 Blue MRF[®] auf 10 Petrieschalen zuerst kultiviert und dann mit 50 000 Phagen der Genbank (5-20 kb Fraktion, siehe 4. Beispiel) pro Petrieschale infiziert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die neu gebildeten Phagen auf Nylonfilter (Stratagene) transferiert. Die Filter wurden dann ent- 60
sprechend den Empfehlungen des Herstellers mit der radioaktiv markierten GAPDH-spezifischen Sonde (siehe Abschnitt A) hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur betrug 58°C. Die Waschttemperatur betrug 58°C. 28 positive Klone wurden gepickt. Von diesen wurden 10 Klone durch Wiederholung des Screeningverfahrens gereinigt. Nach drei Runden der Vereinzelung wurden bei dem Screening 9 stark hybridisierende Phagenklone isoliert, die nach einer Vor- 65
schrift des Herstellers (Stratagene) durch "in vivo excision" in den pBK CMV Vektor (Stratagene) umkloniert wurden. Analyse der Klone durch Verdau mit Restriktionsendonucleasen und DNS-Sequenzierung ergab, daß es sich bei allen neun Klone um GAPDH-Klone handelte. Anhand einer Restriktionsanalyse konnten die neun Klone in 6 Klassen einge- 65
teilt werden. Vom Klon mit dem größten GAPDH-Genfragment, bezeichnet als pGAPTV (SEQ ID NO: 3), wurde die DNS-Sequenz des verfügbaren kodierenden Bereiches (SEQ ID NO: 3, bp 1543-2387) und ca. 1,5 kb der Promoterregion 5' vor dem ATG Startkodon (SEQ ID NO: 3, bp 1-1542) bestimmt.

DE 198 14 853 A 1

c. Beispiel

Funktionelle Verknüpfung des GAPDH-Promotors mit dem Gen der Laccase III

A. Klonieren des Laccase III Gens in den pBluescript Vektor

Für die weitere Bearbeitung wurde das Laccase III Gen aus pLac300 in den Vektor pBluescript umkloniert. Dazu wurde das Laccase III Gen als 3,5 kb Spe I – Sma I Fragment aus dem im 4. Beispiel erhaltenen pBK CMV Vektor isoliert und in den mit Spe I und Sma I vorgeschrittenen pBluescript Vektor subkloniert. Das dabei entstandene 6,5 kb Plasmid wurde pLac301 genannt. pLac301 enthielt zur Verknüpfung mit dem GAPDH-Promoter eine vom pBluescript stammende Not I Schnittstelle, über die mit dem 3'-Ende des GAPDH-Promotors eine funktionelle Verknüpfung erstellt werden konnte (siehe Abschnitt B dieses Beispiels).

B. Funktionelle Verknüpfung des ATG Translationsstartkodens des Laccase III Gens mit dem GAPDH-Promotor

Die 1,5 kb lange Promotorregion des im 4. Beispiel isolierten GAPDH-Gens wurde aus pCAPTV (SEQ ID NO: 3, siehe 5. Beispiel) als Not I – BspI/11 I Fragment isoliert. Dabei stammte die Not I Schnittstelle aus dem pBK CMV Vektoranteil, und die BspI/11 I Schnittstelle vom Start ATG-Kodon des GAPDH Gens.

Vektor pLac301 wurde mit Not I und partial mit BspI/11 I geschnitten und das 6 kb große Vektorfragment, das um den 0,55 kb großen Promotoranteil des Laccase III Gens verkürzt worden war, isoliert.

Das 1,5 kb lange Not I – BspI/11 I GAPDH Promotorfragment wurde mit dem 6 kb großen Not I – BspI/11 I Vektorfragment von pLac301 ligiert und in *E. coli* transformiert. Aus der Anzucht transformierter *E. coli* wurde das Plasmid isoliert. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse und DNS-Sequenzierung überprüft. Der 7,5 kb lange Vektor, in dem das Laccase III Strukturgen funktionell mit dem Promotor des GAPDH-Gens verknüpft worden war, wurde pLac3gap (Fig. 2) bezeichnet. In pLac3gap war die GAPDH-Promotorregion über eine BspI/11 I Schnittstelle funktionell mit dem Translationsstart ATG-Kodon des Laccase III Gens verknüpft.

C. Einbau des Selektionsmarkergens pyr G in den Vektor pLac3gap

Zur Vorbereitung wurde in den Vektor pSCpyrG in die vom Polylinker des pCR-Script SK (+) Vektors stammende Eco RI Schnittstelle eine zusätzliche Not I Schnittstelle eingebaut. Dazu wurde der Adaptor A mit der folgenden Sequenz verwendet.

5' - AATTCGCGGCCGC -3' SEQ ID NO: 12

3' - GCGCCGCGCGTTAA -5' SEQ ID NO: 13

Vektor pSCpyrG wurde mit Eco RI linearisiert und mit alkalischer Phosphatase 5'-dephosphoryliert. Anschließend wurde der linearisierte pSCpyrG Vektor mit verschiedenen Konzentrationen des Adaptors A ligiert und *E. coli* transformiert. Positive Klone wurden durch Verdau der isolierten Plasmid DNS mit Not I identifiziert, wobei durch Einführung einer zweiten Not I Schnittstelle das 1,6 kb große Fragment des *Schizophyllum commune* Genfragments freigesetzt wurde. Dieser Vektor wurde pSCpyrG-Not genannt.

Der Vektor pSCpyrG-Not wurde mit Not I behandelt und das dabei freigesetzte 1,6 kb große pyr G Fragment durch Agarose Gelelektrophorese isoliert.

Der Vektor pLac3gap wurde mit Not I linearisiert und das 7,5 kb große Fragment anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt, um die 5'-Phosphatgruppen abzuspalten.

Das 1,6 kb große pyr G Fragment wurde in den mit Not I linearisierten und dephosphorylierten pLac3gap kloniert, *E. coli* transformiert und von positiven *E. coli* Transformanten die Plasmid DNS isoliert. Positive Transformanten enthielten das 1,6 kb pyr G Genfragment. Durch Restriktionsanalyse wurden Klone identifiziert, bei denen die Orientierung des pyr G Selektionsmarkergens gleich wie die des Laccase III Gens war. Der Vektor von 9,1 kb Länge, der neben dem Laccase III Gen auch das pyr G Selektionsmarkergen enthielt, wurde pL3GpyrG (Fig. 3) bezeichnet.

7. Beispiel

Überproduktion von Laccase III in *Trametes versicolor*

A. Transformation von *T. versicolor*

Protoplasten von *T. versicolor* wurden nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren hergestellt und mit dem im 6. Beispiel beschriebenen Vektor pL3GpyrG transformiert.

Wie im 2. Beispiel beschrieben, wurden Protoplasten des pyr G-defizienten Stammes *Trametes versicolor* F2 100B11 hergestellt und in einer Endkonzentration von 10^5 /ml suspendiert. In Inkubationsgefäßen von 12 ml Volumen wurden 0,1 ml Aliquots der Protoplasten mit 10 µg DNS des Plasmids pL3GpyrG und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde langsam und unter wiederholtem Mischen 1,25 ml einer PEG4000 Lösung zum Transformationsansatz gegeben. Nach weiteren 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsgefäße mit dem im 2. Beispiel beschriebenen OMT-Medium aufgefüllt, gemischt und 10 min bei 4°C bei 2000xg zentrifugiert. Die Pellets wurden resuspendiert und auf osmotisch stabilisiertem MM-Medium ohne Uridin (beschrieben im 2. Beispiel) ausplattiert. Die Platten wurden bei 28°C für 14 Tage inkubiert und auf Wachstum von Kolonien überprüft. Bei verschiedenen Experimenten wurden Trans-

DE 198 14 853 A 1

formationsraten von 0,5-3 Transformanten/ μ g Plasmid DNS erzielt.

B: Reinigung der Transformanten

Mycel der erhaltenen Transformanten wurden gepickt und durch ausplattieren auf frische Platten mit MM-Selektionsmedium ohne Uridin gereinigt. Dabei wurde das Inokulum punktförmig in der Mitte der Platte aufgebracht. Nach Inkubation für 7 bis 14 Tagen bei 28°C konnte radiales Mycelwachstum beobachtet werden. Dieser Reinigungsvorgang wurde wiederholt, wobei das Mycel für das Inokulum vom Rand der ersten Reinigungsplatte entnommen wurde. Selektivplatten wurden dann erneut mit Inokulum der zweiten Reinigungsplatte inokuliert und nachdem die Platten vollständig mit Mycel bewachsen waren, wurde die Laccaseproduktion in Schüttelkolbenanzuchten überprüft.

C: Anzucht im Schüttelkolben

Für die Anzucht im Schüttelkolben wurden 2 cm² Mycel aus einer voll bewachsenen Platte ausgestochen, steril zerkleinert und damit eine Vorkultur von 50 ml (in einem 250 ml Erlenmeyerkolben) Malzextrakt-Medium (siehe 1. Beispiel) beimpft. Die Vorkultur wurde 6 Tage bei 28°C unter Schütteln bei 120 rpm inkubiert. Am sechsten Tag wurde die Vorkultur mit einem Ultra Turrax für 30 sec bei 9500 rpm homogenisiert und damit 250 ml Hauptkulturmedium (Zusammensetzung siehe MM-Medium: im 1. Beispiel) in einem 1 l Erlenmeyerkolben beimpft. Die Hauptkultur wurde dann wieder bei 28°C unter Schütteln bei 120 rpm inkubiert. Die Laccaseproduktion wurde ab dem zweiten Tag der Anzucht täglich gemessen. Laccaseaktivität wurde photometrisch mit dem Substrat ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Ethyl-Benzthiazolin-6-Sulfonsäure) bei 420 nm gemessen. Extinktionskoeffizient von ABTS bei 420 nm ϵ_{420} : $3,6 \times 10^4$ (l \times Mol⁻¹ \times cm⁻¹). Dabei entsprach 1 U Laccaseaktivität dem Umsatz von 1 μ mol ABTS/min bei 37°C und einem pH von 4,5. Das Maximum der Laccaseproduktion in Schüttelkolbenanzuchten wurde 8-10 Tage nach Beginn der Hauptkultur erreicht. Tabelle 3 zeigt einen Vergleich verschiedener Transformanten mit dem nicht transformierten Ausgangsstamm *Trametes versicolor* F2 100. Für den nicht transformierten Stamm F2 100 wurde darüberhinaus die Laccaseproduktion nach Induktion mit dem in der Literatur beschriebenen Induktor 2,5-Xylidin (Yaver et al., Applied and Environmental Microbiology (1996) 62, 834-841) bestimmt. Wie aus Tabelle 3 zu ersehen, ist die Laccaseproduktion im Schüttelkolben bei den besten Transformanten des Stammes F2 100 gegenüber dem nichttransformierten Ausgangsstamm um den Faktor 12 (ohne Induktion), bzw. um den Faktor 5 (mit Induktion) erhöht.

Tabelle 3

| Stamm <i>Trametes versicolor</i> | Maximale Laccaseproduktion (U/ml) |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| F2 100 | 3,8 |
| F2 100/Xylidin* | 9,6 |
| TV Lac3gap-2 | 31,2 |
| TV Lac3gap-3 | 36,7 |
| TV Lac3gap-6 | 45,8 |
| TV Lac3gap-8 | 22,3 |
| TV Lac3gap-11 | 46,1 |
| TV Lac3gap-15 | 15,1 |
| TV Lac3gap-17 | 42,9 |
| TV Lac3gap-21 | 30,6 |
| TV Lac3gap-25 | 18,3 |

* Die Induktion mit erfolgte drei Tage nach Beginn der Hauptkultur durch Zugabe von 2,5-Xylidine (1,5 mM Endkonzentration).

DE 198 14 853 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH
- (B) STRASSE: Zielstattstrasse 20
- (C) ORT: Muenchen
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-81379
- (G) TELEPHON: (089) 74844-0
- (H) TELEFAX: (089) 74844-350

(ii) ANMELDETITEL: Expressionssystem zur Produktion von Proteinen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 13

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 7986 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Trametes versicolor
- (B) STAMM: Trametes versicolor
- (C) INDIVIDUUM ISOLAT: TV-1

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: Laccase I

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AGCTTGCGCG TCCGCATCGC CTCTACCATG GGAAAGAGGC AATAACGCGG CCCCCGCCGG 60
GAATAGCGCT ATGTGGCCCC GTCCCCGGAG CTCTCAAAGC CTGGGATCTC GTCTCTTCAT 120

DE 198 14 853 A 1

| | | |
|--|------|----|
| CATTCCAAGC GGTGACGCT CATGTGCGAC AACGAGCCCG ACTCTGGCT AGCCTGGAAA | 180 | |
| GGCCCCGTGTT CGGAGACAAG ACCTACCCCC GGCATAGGGA GCGGGACAGA TGTGCCGGAG | 240 | |
| GATGAGAACG CGCTGGGTAA GGAGGGCCAG ATACATGTGG GCGGCGACGC CACGGGGACA | 300 | 5 |
| TGGGCGTTTC CGCTTAACCC CTCTTCTTTC CTTTCTTGGC GGAGGATCCT GCCTCAGAAT | 360 | |
| CATCATGCTC GCGGCGCGA AAGCTCTGGC CTCCCGTCCT TCCCACTCTA AACGTACGTG | 420 | 10 |
| ACCATCGGGA TGATCACTCT GGCCATGGAT GCGTCAAACC GACCTGCGAG TGCTCAAACA | 480 | |
| TGTAACCTGAC GCGGCTCTTG CAGGGCGATA CTCTCCGCTC TCCTTGGCTG CGTCGACTAC | 540 | |
| CTTGATACAC CAAGATAGCG CGTTTCTTGC CCAAATAGCG GTCGAAATGC CCGCGCGATC | 600 | 15 |
| CTCTCCCGAG TACTAGCATC CCAACCGATC CGACCCGCTC GAACAGCTCA TGAATTACCG | 660 | |
| AATCCATGGA CCGCCCCATC GCGGTAGTCA GTTACGATCA AGCAGACCTG AAGGGTCTTC | 720 | 20 |
| CAGTGCCTG GGTACACAG GCCATCCGGC GCTGCATCTA CGCGCCTTCC CGGCGCATTA | 780 | |
| TAGACGCTG TGGCCACCAC AGGCTGCTG GCTCTCTTCC GCCACCAGCG CGGCGCACAA | 840 | |
| ACCGTGGGAC CCAGCACACT CCGCCCCACT CTCACACTGS CCAGATTCGC GCGACCGCCG | 900 | 25 |
| CCTTTGAGGC CCAAACAGAT CTGGCAGGTT TCGATGGCGC ACGCCGTCGT GCCTGCCGGA | 960 | |
| TTCAATTGTG CGCCAGTCAG GCATCCGGAT GCCTCTACCA GCGCGGTTGA CTGGAAGAGA | 1020 | 30 |
| ACACCGAGGT CATGCATTCT GGCCAAGTGC GGCCAGAGGA CCGCCCGCTG GTGCGGGTAC | 1080 | |
| TTAAAGGGCG GCGCGGGGAG GCCTGTGAC CAAGCTCAAG CTCGCCCTTG GTTCCAGTC | 1140 | |
| TCCGCCATCC TCCTCTCTCC CCACACACTC GCTCCATATC ACGCTCGGCG CCATGGGTCT | 1200 | 35 |
| GCAGCGGTT AGCTTCTTCG TCACCTCTCG GCTCGTCGCT CGCTCTCTTG CAGCCATCGG | 1260 | |
| GCCGGTGGCG AGCCTCGTCG TCGCGAACGC CCGGCTCTCG CCGGACGGCT TCCTTCGGGA | 1320 | 40 |
| TGCCATCGTG GTCAACGGCG TGCTCCCTTC CCGGCTCATC ACTGGGAAGA AGGTGGGCGT | 1380 | |
| GTTCGTTGTC GTCTACTCC TTTACTGACA GCGATCTACA GGGAGACCGC TTCCAGCTCA | 1440 | |
| ACGTCGTCGA CACCTTAACC AACCCTCCA TGCTCAAGTC CACTAGTATC GTAAGTGTGA | 1500 | 45 |
| CGATCCGAAT GTGACATCAT CCGGGGCTAA TTAACCGCGC ACAGCACTGG CACGGCTTCT | 1560 | |
| TCCAGGCAGG CACCAACTGG GCAGACGGAC CCGCGTTCGT CAACCAGTGC CCTATTGCTT | 1620 | 50 |
| CCGGGCATTC ATTCTGTAC GACTTCCATG TGCCCGACCA GGCAGGTAAG CAGTCTTTGT | 1680 | |
| TGTGATCCTC GTGTGATGCA ATGTTCTCAT GCTCCGACGT GATCGACAGG GACGTTCTGG | 1740 | |
| TACCACAGTC ATCTGTCTAC GCAATACTGT GACGGGCTGC GAGGACCGTT CGTCGTGTAC | 1800 | 55 |
| GACCCCAAGG ATCCGCACGC CAGCCGCTAC GATGTTGACA ACGGTACGTG CGCCACGGAG | 1860 | |
| TATATCACAC AGCATGCGTT GACGTGGGC CAACAGAGAG CACGGTCATC ACGTTGACCG | 1920 | 60 |
| ACTGGTACCA CACCGCTGCC CGGCTCGGTC CCAGGTTCCT GTAAGCTCGC AATGGATTAG | 1980 | |
| TTTTTACGGA TTATTGCTT ATGTTGCGTC GATAGACTCG GCGCGGACGC CACGCTCATC | 2040 | |
| AATGGTCTTG GCGGGTCGGC CTCCACTCCC ACCGCCGCGC TTGCTGTGAT CAACGTCCAG | 2100 | 65 |

DE 198 14 853 A 1

| | | |
|----|---|------|
| | CACCGAAAGC GGTGAGCATT CTCTTSCATG CCATTTCAAT GCTCTAAATT GACCTATCGG | 2160 |
| | CACCAAGCAG CTACCGCTTC CGTCTCGTTT CGATCTCGTG CGACCCGAAC TACAGTTCA | 2220 |
| 5 | GCATCGACGG GCACAACTCG ACCGTCACTG AGGTGACGG TATCAACAGC CAGCCTCTCC | 2280 |
| | TTGTGACTC TATCCAGATC TTCGCGCGCG ACGGTACTC GTTTGTGGTA TGTCTGCCG | 2340 |
| 10 | TCTTGGTGCT TCCAAAGTGS CCTCGCTCAG CCATTCCTTT AGTTGAATGC GAACCAAGC | 2400 |
| | GTCGGCAACT ACTGGGTCCG TGCBAACCCG AACTTCGGAA CGGTTGGGTT CCGCGGGGGG | 2460 |
| | ATCAACTCCG CCATCTGCG CTACCAAGG GACCGGTCC CGAGCCTAC TAGACCCAG | 2520 |
| 15 | ACGCCCTCGG TGATCCCGCT CATGAGAGG AACTTGAAG CCTCGCTCG CATGCTGTG | 2580 |
| | GTACGTTTCT TTCAATCATA TAATGACCGG GTGCGCGAGC TCACCGCGCG CTCCTATCCA | 2640 |
| 20 | GCCTGGCAGC CCGACGCGCG GAGGTGTGCA CAAGGCACTG AACCTGGCCT TCAACTTCGT | 2700 |
| | GAGTGTCTAT ACCGCCCCAT TTGGGGTCTT GGTACTGATC ATGCGGCGCA ATAGAACGGC | 2760 |
| | ACCAACTTCT TTATCAACAA CGGTCTTTT ACACCAAGCA GAGTCCCCGT GTCTCTCCAG | 2820 |
| 25 | ATCTTGAGCG GTGCGCAGAC CGCACAGGAA CTCCTCCCTG CAGGCTCCGT CTACCCGCTC | 2880 |
| | CCGGCCCACT CCACCATCGA GATCACGCTG CCGCGGAGCG CACTAGCCCC AGGCGCGCGG | 2940 |
| 30 | CACCCCTTCC ACCTGCACGG TGTACGTCCG CTCCTCTCTC TCCCTCTCTG CACAAGTGT | 3000 |
| | CACGTCCAGC CCTCTAGCA CGCGTTGCGG GTGCTCCGCA GCGCAGGCAG CACTACGTAT | 3060 |
| | AACTACAAAG ACCCGATCTT CCGCGACGTG GTGAGCACCG GCACGCCCGC CGCGGGCGAC | 3120 |
| 35 | AACGTACGA TCGCTTCCA GACGACAA GCGGGCGCGT GGTCTCTCCA CTGCCACATC | 3180 |
| | GACTTCCACC TCGAGGCGGG CTTCGCGATG GTGTTGCGGG AGGACGTTGC GGATGTGAAG | 3240 |
| 40 | GCGGCGAACC CGGTCCCAA GCGGTGGTCC GACCTCTGCC CGATCTACGA CGGGCTGAGC | 3300 |
| | GAGGCCGACC AGTGAAGCGA GGTGTGTGTT AGCTGAAGC TCGAGCGTCG ACCTTGGGGG | 3360 |
| | ATTTGGCAAG GTGTCTCAT TGAAGTAGTC TTTGGGTTTA TTCGTTGTIA TTCTAACTCG | 3420 |
| 45 | CTTCTCTACG GAATGACTGA GAGTTGTATA GGATGAAGTA ACTTTCTTAA TATATGATAT | 3480 |
| | CACTTGACAG AGGCATGGTG TGCAAACTGT GTGCATTGTG GTAGTGGTTT AGGCCCTTCA | 3540 |
| 50 | AACAGGCTGT CAGTTTTATC GGGGGAGATG AAAGGGGGCA TTGGGAGGGC TGAAAAGCAT | 3600 |
| | GCTATGTCTG GTAACATGGT TATAGTAAAC GTGCATTACA TTGACCAAGA ACGACAAGAA | 3660 |
| | CTACCAGGGT TGTTACATCA GTAGCATTAA GAACAAGATG TGCATTATGT CGAACACAGC | 3720 |
| 55 | GACGTGATAC TATGTTCTT AGCGATTCTA CCAAGGTCTA CGGTCAGGTG AGGTCGATGG | 3780 |
| | CATCTCTTC ATCGTACGCC AACTTCTGCG GTTGTCTCTG TCGGTGTGCC GAATCGTCTA | 3840 |
| 60 | TGGGCGCCGG CTTCGAGCCG GACCCGCTCG CGCGACTCGC TTCAGGATTT ATGCGCGGAT | 3900 |
| | AGCAATCGCA GACAGGTGCA GATGGGGAGG TAGGCTGAGT CTAAGGCTGA ACGACGTTTT | 3960 |
| | AGACGCGTCA ACTTGACGTC CGCGTCAAAC CACAAACGC GTATGTACAG CCGATTCCCG | 4020 |
| 65 | | |

DE 198 14 853 A 1

| | | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|----|
| CCGCGCGCTT | GAGAAGTTGA | GCTCCCGAAA | ACGCCGGACA | ACGCTCAAAT | GTACGGTTCC | 4080 | |
| TGCGCTGCAC | CATTCGTACC | AGGATCGTAC | GGGAGCTAAT | ATGCGGGCGT | GTAAAAATTT | 4140 | |
| TAGATAGAAA | AATACATACA | AGTTGCTGGA | CGACGAGGAT | ATGAAAGCGT | TAAGTTCGAA | 4200 | 5 |
| GCATGCCGGG | CTAGATTGGA | TCCCGGGTTA | TCGAAGTATG | GTCGCGGCGC | GGAAGCGCCA | 4260 | |
| CCCGCGAGGC | GCACTGGAAG | CACCTGCATA | ACGCCTTTGG | GCAAATCGTG | TGTTTGCTCG | 4320 | 10 |
| ACGCCGACAG | CGGGGAGGAA | CGGCGGTCCCT | CCATGGACTA | GAGGGCCTCC | TTCGCTTGCA | 4380 | |
| TTAGCCACAT | GGCAGGATGA | AGAGAGAAGG | AATAGACGCC | TAACCGCGCG | ACCAACGCGC | 4440 | |
| CTAAGGCGCG | CGCCCTTCCG | CGCACTCTCC | TTCCGCAACC | GCCAATTGCC | TACGCCTCAG | 4500 | 15 |
| CTACACAATC | TGCCCCCTTG | TCGTGCTGCC | GCGTTCATCT | TGCTCGCTTT | GCTAATAAGA | 4560 | |
| ACTTGAACGT | AACATTCGCA | CTTGGGCCCC | GCTGCACCCA | TGACGAAAAG | ACCCAGCGCC | 4620 | 20 |
| TGGGACGTTA | GCTTCCCGA | TGAAGCCGCC | GCAGGTACAT | CCGCGGCACT | CGCGCCATCG | 4680 | |
| CAGGCTCCGG | ACGGCGTACC | GCATAATCCT | CCCAGGAGAA | GCGCGACATC | CAGAAGTGAA | 4740 | |
| TCCCGGAGGG | ACTCTGAACC | AGTAAGCTGG | TGTACTTTAC | TTATCTCAGT | CGTAAACTTA | 4800 | 25 |
| CCCCATACAG | GCGGCCAAGC | GTCCGAGAGT | CCTGCAGCCT | GAGGATCGTC | GCAAGACTCT | 4860 | |
| GCCAGGACCG | AGTAAGCAG | TTTCCTTATG | AAAGAAGCCA | GTCTTATCAT | GTCGCCTCCA | 4920 | 30 |
| TACAGAGCGT | GCGTACGTGC | CCACGCCCCG | AGATATCAAG | GAGGACGTCA | ACACGGTCTG | 4980 | |
| CTTCGGCGAA | GACGCGSTTG | AGCAGTCGGG | CGCAAGCCTA | GAGAAACCCA | TCCGCGCGCT | 5040 | |
| TTCCGATTTT | GTAGTGTTTG | ACCCGACGCG | GGGTTTCGAG | CACATCATGC | TCGACGTTTT | 5100 | 35 |
| GGACAATGCA | ACGCCTGGAC | GCCATTTCTG | GGCCGCCGGC | CAAGTAAGGC | CTATATTCTT | 5160 | |
| GAATGAGGAA | GATGAGGGCC | AGGAAGATGG | CCTGGATGAC | GGAGACGGCG | GCGAACAGGC | 5220 | 40 |
| TCGTCAAGTA | CAGCGTATAA | GAACGAGTGC | GATATTCCGG | TGGTCTCTCG | ACTATACGAA | 5280 | |
| GGTCGACGAG | TAAGTGGTCC | TGGGAAGGTC | TTCTTCCATC | GTGGCTTACC | CTTTCTTGAC | 5340 | |
| CAGCCCACTC | TATATTGAAA | CCCAATATAG | CTGTTTTGAG | TTGCGCGCGC | CGGCCCACTC | 5400 | 45 |
| CTACCAGCGC | ATTCATCAGC | GTTTCTACCG | TCCTAACCGC | ATCGCGCAAA | TCCTCGTCTC | 5460 | |
| GACAGCAATC | AAATCACCAG | CGATGCCCCCT | CGACGAGTTT | GCAGAGGCGA | ACTACGGGGA | 5520 | 50 |
| ATGGGACGCT | ATGCTCGGCG | AATATATTTT | CCGAGAAGAC | ATACAAGAAG | CCGTATGTCT | 5580 | |
| GCCCTCTGGT | CAACGTATTC | TCGCTCTTAT | CTTGTCGAGA | TGCCCTTCGT | TCGGACCGTC | 5640 | |
| ATTGACGGAT | GTGAACCAGA | CGTGAGGCGG | CGGTTCTCTG | ATGCTCAGTT | TATCGCCGAC | 5700 | 55 |
| CTTCTGCGTC | GTCAATCCAC | CCCGCACGTC | CAGACCTCCG | TTCCACGGCC | ACGTGTACCG | 5760 | |
| CCCCCGCAAT | ACGTCAACCT | GACGAGTCTC | ACGGGGAATC | TAGATCTCCT | CGTACTGCAA | 5820 | 60 |
| CCGGAGAAGC | AGAACCCTAC | GCATGTTTCT | GCCTTGATAG | ACGTCTCTCG | TTTGGGACTT | 5880 | |
| TTTCACGAGC | ACCTGAAGGT | GGTCGGCCCC | CCGCCAAAGC | ACCCGAGCAA | GCACACCCCTC | 5940 | |
| AAGCTCCAGC | AGGCCAAGAT | GCGATTGGCC | TTGACGGAGC | TCGCTAATCG | CTGCATCGAT | 6000 | 65 |

DE 198 14 853 A 1

GACAACACCA CGATCAGCTT TCCACACAAT CGACGACTGC GCGAGAAGTA TTGGAGCGCT 6060
 STCATASTGG ACGGCGTCAC TTACGAGGTG GCCTTGTGTG CAGGCTTGTA TTGCTGGCC 6120
 5 ACGGCGCGTG ATATACCTCT GTGATTAGA TAGGCGACTG CGTTGTGTG CAAGCAAACA 6180
 CATATCGGAA ACGACCACCT CGCAATCTCC CGGACGACCT GACCGAACTT CCGGCGACCG 6240
 10 CAATCGCTGC CGATTACTTD TGGTACGTTG TAATTTTCGC TTGTTACTAT CGCACTCAAC 6300
 GCTCTTCGCC CAGGTTTGGC AAGGTCATAT ACATCGACCA ACACAAGAAG ACGCTCCATG 6360
 TCCAGTGGTA TGAACATTGG TCGAAAACCT ACTTGGATGA GATCTCGGAT CCGCACGAGG 6420
 15 TCTCTTTGTG GCCAACGTGC GATGATATTG ACGCCAGGAT CGTTGTGGGC AAGGCTACGA 6480
 TTCATCGGCG TCCTCCGACT GATAAGGACT TTGGAGCTCT GGAATACTTC TGCCGCTGAG 6540
 20 TTGTTCTCTT ATTTGCCTCG TGCTGACTAA CATTTGCTGC ATGCTCGATA GCTTTGCCTA 6600
 CCATGAGGAA GATGGTTCTT TCCAGGACAT CGACGACAGG ACGATTTTAC TGCTGCAGAC 6660
 TGTCCACCCC CCGGAAATTT GTGCTACATG TCATTTCCAA GAGCAACAGA CCGAGGAGTC 6720
 25 GACTTGCGTC GTGGAGGGCG GCGCCCTGCA TTATGCTGG CACACATATC ATGTGGACGA 6780
 CTATGCTCTC TACGCTGCCT CAGCGGTGG ACCAGCTGT GTCGGTAGGA TCACGGAGAT 6840
 30 CCATTCGCTT CCGCCCGCTC GAGCTTCGAC TTCCCCCAAG GTCCGTGTCT CTCGACTAGG 6900
 CCGGAGGTCT GATGTGGCTT ATTTCCCAAA CAAGATGCTC CACGAGGTGT GCATCAGTTA 6960
 TGCTCTGCAT AAAGTCTTTG GTTTGATTGA TATTCATGCA GCGGAGCTC TTCTGACTG 7020
 35 GGCCAAACAGA GACAGTAGAA CTGGATGCGA AGGCCCTTCT GAAGCCATGT GTGGTGGTAC 7080
 ACAAGTCCGA TGTGCTTGAC CTGGAGGCTT GGTTTGACAT CTCGCCCTTC AACTTCTACG 7140
 40 CCGGSTATCG GCTCCCTACC TTGAACAGCC CTTGGGCACA GAAGAAAATA CTGCACAGAA 7200
 CAGATGTTCT GGCTTGTGAT ATCTGTATAG AACACATAA CGAACGGTTT CAGCTTCTGT 7260
 CAGACCTGAG CTCAGGTGGT CAGGTTTGTG TGCGCACTTT CGACCCCTTC GGAGGAGTGG 7320
 45 GGGCCTTTGG ACTCGCCATG GAAGAACTCG GCTGCATGAA ACTTACACAT GCTGTGGAGA 7380
 TCACTCCCAG TGCCGCCCTG AACTTAAGGT ATGTGTTTTT GTGGAGATAA ATCTATGGCT 7440
 50 AACTCTATTG TAGGAAAAAC TCACCAGAGA CAGTGTATT CAACCAATGT TCCAACCTGG 7500
 TATTCCAGTA TGCTGTCAAG TACCATGCCG GAACCTCAG CAGCAATGAT ATGSTGAAGG 7560
 ATCTTTATGA CAACACTCCA ATTGGCAAGC CTCCTGCCC TGGGGATATT GACTGCATAG 7620
 55 TAGCAGGTTT CCCTTGGTGA GCCCAAACCT CTTGATATTT CTTCACTACT GACTATCACT 7680
 CATAGTCAGC CCCATTCCTA GCTCAACATG TTCAAGAAAG CCAACGATCG GAAGACAAAC 7740
 60 TTGATACTCA ACCTTCTGTC CTGGGTGGAC TTCTTGCGSC CGAAGTATTG TTTCTTCGAG 7800
 AACGTGCGCG GCTTCTTGAG CTCCACTCTC CATGCAAGAC AAGCGAGCAA ATACCGGGTC 7860
 GAGGGCGGCA TCAAGATGGG CGGCTTGAAG TTCCTTACCC GTTCACTATT GGCTATGGGG 7920
 65

DE 198 14 853 A 1

TGAGTGTCTC ACGCGCTTAT CATACAGGAA GCTTGCATGC CTGCAGGTCG ACTCTAGAGG 7980
ATCCCC 7986

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 5762 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Doppel
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Trametes versicolor
 - (B) STAMM: Trametes versicolor
 - (C) INDIVIDUUM ISOLAT: TV-1
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 - (B) CLON: Laccase III

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

| | | |
|---|-----|----|
| TGGAGCTCGC GCGCCTGCAG GTGACACTA GTGGATCTAC CTCCCGTGAG AGGAACGACG | 60 | |
| GCGTCGGGCC TTTCTCAGC GCAGCGCCGA CTTGCGCGCA CAGCCGCTGG TCAGGGCAGC | 120 | |
| ACAGACATCT CCCATCACCC AGCTTATACG CTCAGTTCCG GCACCGAGTC TGACGAATGC | 180 | |
| GGCCCCGCTG CAATCCCGAC ACTGCTCGGG GCGCGCGATC AGACTTTCCG TGAGGACGTA | 240 | 40 |
| AGGTGCTGTC GGCCACCTCT CGACGCTCTC ACGCATACCG CAGAATTCGC GCGACGACCG | 300 | |
| CGTTCCAGGG CCCTTGACAG ATGCTGACAC CGGTGCAATC TTGACACTGT ACCAACCAGG | 360 | 45 |
| TAAGTCTCGT CCTTGCTTCT CGGGGACTGG CGCCGGTCGC TACCCCTTGG TCATTCACTC | 420 | |
| TACCAGAGCG CTGGCTTCGC CGAGGTATAA AGGATGTTGC GCGAAACCCT CAACACCCCA | 480 | |
| ACTCAAGCCC CACTTGAGCT TTTGCGAGAT CCTCCACATA CCACTCACTA CTTTCAAGTT | 540 | 50 |
| CTTCAACATG TCGAGGTTTC ACTCTCTTCT CGCTTTCGTC GTTGCTTCCC TTGCGGCTGT | 600 | |
| GGCCCCAGCT GGTATCGGTC CTGTCGCCGA CCTCACCATC ACCAACGCAG CGGTCAGCCC | 660 | 55 |
| CGACGGGTTT TCTCGCCAGG CCGTCGTCGT GAACGGCGGC ACCCCTGGCC CTCTCATCAC | 720 | |
| CGGTAACATG GTTCGTCTCG GCGCGCACTA GCGGATTGTA TCGTTCCTGA CACACTGTTG | 780 | |
| CAGGGGGATC GCTTCCAGCT CAATGTCATC GACAACCTCA CGAACCACAC GATGCTGAAG | 840 | 60 |
| AGCACCAGTA TTGTGAGCTA GTATTCCTCC TGGAGGAGGC TTCATTGTGC TAATAATCGT | 900 | |
| CGTGTCCAGC ACTGGCACGG TTTCTTCCAG AAGGGCACCA ACTGGGCCGA CGGTCCCGCC | 960 | 65 |

DE 198 14 853 A 1

| | | | | | | | |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| | TTCATCAACC | AGTGCCCGAT | CTCATCTGGC | CACTCGTTCC | TGTATGACTT | CCAGGTTCCT | 1020 |
| | GACCAGGCTG | GTAAGTACGG | TCGTTATGGA | GTGTACTGCG | CATTGCTAAA | TCGCATSGTG | 1080 |
| 5 | AACAGGCACC | TTCTGGTACC | ACAGTCACTT | GTCCACSCAG | TACTGTGATG | GTCTGAGGGG | 1140 |
| | TCCATTCTGT | GTTTACGACC | CGAATGACCC | GGCCGCCGAC | CTGTACGACG | TCGACAACGG | 1200 |
| 10 | TAAGGACGAA | TTCGAACCGT | AAATACCCCG | TTACTGATAA | CTTTCCGACG | AATTAGACGA | 1260 |
| | CACGGTCATT | ACCCTTGCCT | ATTGGTACCA | CGTCGCCGCG | AAGCTGGGGC | CCGCATTCCC | 1320 |
| | GTAAGTCCAT | GGGCATTGTG | CTATTGAATC | TCTCTTAACT | GTGCATATCA | GTCTCGGGCG | 1380 |
| 15 | CGACGCCACT | CTCATCAACG | ATAAGGGACG | CTCCCCCAGC | ACGACCACCG | CGGACCTCAC | 1440 |
| | TGTTATCAGC | GTCACTCCGG | ATAAACGGTA | TGCTATATCT | TATCTTATCT | GATGCTACTT | 1500 |
| 20 | TACTGAGACA | TGCTCTAGTT | ACCGTTTCCG | CCTGGTGTCC | CTGTCTGTGG | ACCCCAACCA | 1560 |
| | CACCTTCAGC | ATCGATGGCC | ACAACATGAC | GATCATCGAG | ACCGACTCGA | TCAACACGGC | 1620 |
| | GGCCCTCGTG | GTGCACTCCA | TTCAATCTTT | CGCCGCCGAG | CGTTACTCCT | TCGTGGTAAG | 1680 |
| 25 | TTTGATTCCT | TTCATGAGGT | TGGTGGCAAT | TAGTGATTGT | ATGGTCTATG | AGCTCGAGGG | 1740 |
| | CAACCAGGCC | GTGACAACCT | ACTGSAATCG | CGCCAAACCG | AGCTTCGGTA | ACGTCCGGTT | 1800 |
| 30 | CACCGCGCGC | ATCAACTCGG | CTATCCTTGG | CTATGATGGC | CGCGCTGCCA | TCGAGCCGAC | 1860 |
| | CACCAACGAG | ACCACTTCGA | CGGAGCCGCT | CAACGAGGTC | AACCTGCACC | CGCTGGTTGC | 1920 |
| | CACCGCTGTC | GTAATGAATA | TCTTCCGTGA | TTGAGGCGAT | CGTTGCTGAC | TTGACCCGCG | 1980 |
| 35 | ACAGCCTGGC | TCTCCCGTTG | CGGGTGGTGT | TGACCTGGCC | ATCAATATGG | CGTTCAACTT | 2040 |
| | CAATGGCAAC | AACCTCTTCA | TCAACGGGCG | GTCTTTTACG | CCCCCGACCG | TGCTGTCTCT | 2100 |
| 40 | CCTCCAGATC | ATCAGCGGCG | CGCAGAACGC | GCAGGACCTC | CTGCCCTCCG | GCAGCGTATA | 2160 |
| | CTCGCTCCCC | TCGAACGCCG | ACATCGAGAT | CTCCTTCCCC | CGCACCGCCG | CTGCCCGCGG | 2220 |
| | TGCGCCCCAC | CCCTTCCACT | TGCATGGGCA | CGGCTTCGCG | GTCTCTCGCA | GCGCCGGCAG | 2280 |
| 45 | CACGGTCTAC | AACTACGACA | ACCCCATCTT | CGCGGACGTC | GTGAGCACGG | GGACGCCTGC | 2340 |
| | GGCCGGTGAC | AACGTACCCA | TCCGCTTCCG | CACCGACAAC | CCCCGGCCGT | GGTTCTCTCA | 2400 |
| 50 | CTGCCACATC | GACTTCCACC | TCGAGGCCGG | CTTCGCCGTC | GTGTTCCGCG | AGGACATCCC | 2460 |
| | CGACGTCGCG | TCGGCGAACC | CGTCCCCCA | GGCGTGGTCC | GACCTCTGCC | CGACCTACGA | 2520 |
| | CGCGCTCGAC | CCCAGCGACC | AGTAAATGGC | TTGCCGCCGT | CGATGATAGG | ATATGGACGG | 2580 |
| 55 | TGACTTCGCA | CTTGCAATAC | GGACTCTCGC | CTCATTATGG | TTACACACTC | GCTCTGGATC | 2640 |
| | TCTCGTCTGT | CGTCGGAACA | AATTTGTATA | ATTCGCTTAA | TGGTTGAAAC | AAATGGAATA | 2700 |
| 60 | TTGGGTATT | ATGCACGCAT | TTCCCTGTTT | GAGCGATGGA | ATGATCCACG | GTTAAAAATG | 2760 |
| | CGTTAGCGTA | ACTTCAAGTC | GACCATGCTT | AGCTGTAGTG | CACCTGCGGT | ACGAGGTGTT | 2820 |
| | ACGCTTTTTG | CACGACTCCT | TACTACTCAA | CTATACTCAA | CGCTATAGCT | CTAGGTTGCA | 2880 |
| 65 | GGCAGTTGGC | GTTCAATATG | ATGGAACATA | TAGCTCCATA | CATTCTGGTT | GGTTGTACAC | 2940 |

DE 198 14 853 A 1

| | | |
|--|------|----|
| TGCGTGTTTA CTAATCGCTA CAAGATACAT CCACTTCACG AACTGCTATC TTTGGGCCAC | 3000 | |
| GTCGCGATCT TCACCGCGCT CCCCCTGAGC GTGAACGTGT GCGTCAGCTT CGCGTCCGTG | 3060 | 5 |
| TCGAGCGCGA GCGGTACGT CCCAGGGTGC ACCCACTTCT CCCCATCCTC ATCCGCGCGC | 3120 | |
| GCGATCGCGC CCAGCGTCAC CGGCAGCTGC GCGACCGTGC TCCCCCGCGG CGCGAGCCCA | 3180 | |
| TGGATGCGCG TGTAACGCGAC GAGCGTCTTC TTCGGGTGCG GCGCGGGGCC AAAGGAGCCA | 3240 | 10 |
| CTCACGAACA GCAGCGCGAC GTAGTCGGAC GCGACCTTCC CCGTGTTCGT CACGCGCACC | 3300 | |
| GCGAACGTGT CGAGGGGCGC CAGGTCCAGG AACGCCACGC TCTCCTGGCC GTGCGTCACC | 3360 | 15 |
| AGCTGCGAGA TGGAGTACGA TTTCCGGGG CCGCCGAACG ACGCGGTGGA GTCGGCGCCA | 3420 | |
| GGGGCGGGCC AGGCGAACGC GAAGTTGTG TAGTGCAGCC CGAAGCCGAA CTCGAAGACT | 3480 | |
| GGGGTGCCGG AGTACCACTT GTACGTGCGC CCGGGGTTGG TCGCGCTCGG GCGCAGAGTC | 3540 | 20 |
| ATATCCGTCA TCGGGACCTG TTCGGCGTAC GCGGCAGGGT ACTGCGTGAT GGGTAGGCGT | 3600 | |
| CCCCGCGGGG CCGCCTTGCC CGTGAGGATG TCGAAGAGCG CGGTGCCGCC GCTCTGGCCG | 3660 | 25 |
| GGGTAGCCGC CCCAGATGAT TGCGTTTACC TGGTGGAGTA GATGTGCACC CGCGTGATTA | 3720 | |
| GCTCCTGTCT GGGGCGTAGT TACAAGCAAA AGGGAATGGA ATGGTACGCA CTGCTTTACT | 3780 | |
| GTGCTTGAGG GCGGTGTCTG CGAGCTGGCC GCCACCAAC TCGCGGACGA TCAGCGGCTT | 3840 | 30 |
| GCCTACGCGC TCTAGTTCCG CGACGAGGTC GAGTTGGTTT CCTGGCCAGG TTACGTTGAG | 3900 | |
| GCGGTCTATC TCCTCGCGCT CGACCGTTTC GTCGAGCCCT CCGCGGAAGA CCACCGCGTC | 3960 | 35 |
| CGCGCGCTTC GCGGCAGCGA CGGCGGCTGC AAAGCCGCTC GTGTGCTTGC GGTAGTCAC | 4020 | |
| GTTGGTGCCG AATACATACT CCACCTCAAA TCCTGCTTGC TGGGCACCTT GTACTGGGCT | 4080 | |
| CACGAGGTAA GGGGCGATAC CGAAGTAGTT GCCCTGCATG AGCCGCGTGG CGTTGCCCCA | 4140 | 40 |
| GGGGCCGATG AGCGCAAGCT TGCGGACGCG TTTCGACAGC GGGAGGAGCC CGTCGTTCTT | 4200 | |
| CAGCAGGACC ATGCCCTCGA CGGCAGCGGT ATGTGCGAGC TGCTGAGCTT GCGGAGTGTT | 4260 | 45 |
| CACGTGAGGC CATCCTAGCT GACGGTAAGG TTGTGCCGCT GGATCGTCGA AGTAGCCGAG | 4320 | |
| GCTGCAGAGT TCGTTTAGAA TAGATTTCCG GCATAACAGA AGGTCACTTA CCGGACGAGC | 4380 | |
| GATGCGTATT GGCGGATAGC TGCTCTACGG AGGTCCGTCG AGTTGACCAA ACCCCGTTGC | 4440 | 50 |
| AGCGCCTCGG GAAGATAGGT GGACGAGAAT GTCCACAGT CGATGTCAGT TCCTGCGAGC | 4500 | |
| AGCGCGTCCG CCGCCGCTTG CGCCGGGTCG GTGGTATAGT TGTGCGGCGT GAAAATGTTT | 4560 | 55 |
| TGCACAGCGT CGCAGTCGCT CGTAACCCAC CGATCGTCCG TAAAGCCCCA GTGGTCGCGG | 4620 | |
| AGCACGTCCT GCAGCAGGAA GCTGTTTCGA CACGACGGGA TGCCGTTTAC GCGGTGTAC | 4680 | |
| GAGCACATCA CGCTCGCGAC CTTCGCGTCG CGCACGCACG TCTGGAACGG CGGGAGGTAG | 4740 | 60 |
| AACTCGGACA GGTCTGTCTG CGAGACGACC GCGTTGAACC CGTAGCGCAC GACGCCCTCC | 4800 | |
| CAGTTGTCCA TGTCGTACGC GGCGAAGTGC TTGCAGTCGG CGACGACCTT GAAGTACGGC | 4860 | 65 |

DE 198 14 853 A 1

TTCGGGTCGA GCGCGCCTTG CAGGCCCCAGG ATGAGGTTST AGACATATTG GGAAAGGTSG 4920
 AACGGATCCT CTCCCGGGGT CTCCTGGGCG CGGCCCCATC GGGGATCCTT GAACGCTATT 4980
 5 AGACGCTGTT TGGTGAGCGG TCCACACAGG GAGAGTAGAA GAGAAGACTC ACGGTTGATA 5040
 TTGGGCGTCC AATAATCGAG ACCAGCGCGG CCGACGTTST TGAAGGCACG CCATTCTGTG 5100
 10 CTCACGATGG TCGCGATC3C TTGAATGAGT GGGTCATCGA ACGCGGCACC CATCAGAAATG 5160
 GTTTGGGGGA AGGAGGTC3C ATAACTGAAA TTGCCGGATG GTGCAAGGT CACACCCGGG 5220
 CTCTGGGCTA CACCGTGCTA AACATAAAAA TGATATATT GCGACATAGA TAGGCCGAGA 5280
 15 TACGTACCAA ACCTCTGAC CACGAGTTGT AGGCGGGAAG ACCTAGACGG GGTACACCCG 5340
 GAGAGGCGTT GACTGTGTTG TTAGTGAGCT CCTGTCAGT CCAGATGCTA ATGAGCGCGG 5400
 20 TAGCTCGAGT GATAGGGTCC TTGGTGACAT CACAGACGGC GTTGTCTTC AGCGGGCCGT 5460
 TGACACAATC CGGGAAGCCA TACGCCCCGAA CGGTCGAGC GCGACGAG AACGCGGTGA 5520
 GAAACGCGTG GAGACGAGC AGACCGTTCG CTATCTAGAC AGGCAGSAAC GTGAGGAGAC 5580
 25 AGTCCACAC GAACCGTTC ATTTTGCCCT CTCTTTTAA GGGGAAGTGG GCGTTACGTG 5640
 CCAGGGAGAA CGTCGAGCT GGGGGCGAAG AGCATGATCC AAAGAATTCA AAAAGCTTCT 5700
 30 CGAGAGTACT TCTAGAGCGG CCGCGGCCCC ATCGATTTTC CACCCGCTGG GTACCAGTAA 5760
 TT 5762

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 2387 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 40 (C) STRANGFORM: Doppel
 (D) TOPOLOGIE: linear

 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)
 45 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iii) ANTISENSE: NEIN
 50 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Trametes versicolor
 (B) STAMM: Trametes versicolor
 (C) INDIVIDUUM ISOLAT: TV-1
 55 (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 (B) CLON: GAPDHTV

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

60 CAGTATGTGA AGCCTCTGGG GATTCCTGTA GAATCATATG TGAGGAACCG ACGAGCTTCC 60
 CATGCTTCCA CCGCATATCG TGTAGTCTCC TACCAAGCAG TAACCCTAAC GGCTCTTTCG 120
 65

DE 198 14 853 A 1

| | | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------|----|
| GTACACCGTA | CGGAGTGCGA | CGGAAAGGTC | GCGGACGTAG | TGAGAGAAAC | GATATGTTCA | 180 | |
| CAAGACCTAT | ATCATGAGAA | CAGGAACGCT | AGAGTCGTCT | GCCGAAAACA | AGTCGGGTAT | 240 | |
| CCGTGAGGCA | GATATCACGT | TGACCAGGTT | TGCGTTGGTG | GCGGATGTTG | CGACGGTTTG | 300 | 5 |
| TACGTACCGT | ACATGGCGTA | CAAGACGCGG | GAGTGAGCCG | TGCAAAATGG | GACGAATAGG | 360 | |
| AACCCCGTAG | CCGATATGGA | CCGCACCGGA | GGGATTGTTG | CCCATACATA | AGCCATATGT | 420 | 10 |
| TCTCGCCGTG | CCGCGCCGAG | AGCTGGTGTG | CGCACTAGTG | GGTGCTATTA | GAAGCCGAGC | 480 | |
| GAGGTACCGT | CCCTCAGGCC | AATTGGGGAA | TAGGACGGAG | GCATTGAGT | AAAATACACA | 540 | |
| TGGGCATGCC | TGGATGGAGG | CATGCACATG | CGCAGGAGGT | TAGTGCAGCG | CGGCCAATAG | 600 | 15 |
| GAGGCGAGGA | CGGAGTGAGA | TCAGGAGCGA | GTCTGGACGG | GCCGAAGAGT | GAGCGAGAGC | 660 | |
| AGAGGCGCGG | TGTGGCCGCA | CCTGATGTTA | GAGCAAAGCT | TATTTCTGAA | CTCGCGGCTC | 720 | 20 |
| GTGGAGGCCA | GACAGGAGTA | CGAGCATAGA | CAGGCGAGAG | CGGCCGGCGA | GGCGTCGAGG | 780 | |
| TCGGGCGGAG | ATCACGTCCA | TCCGTCCATT | CTGTCTGCAG | CCTGTGCTTA | CAGGCACCGG | 840 | |
| GACAGAGGCG | TACGATGACG | TCGTATCGGA | CGGAGGAGCG | CACGAAACGG | AGCGCGGATC | 900 | 25 |
| TTGATGTTTG | CGTTAGAGAG | CAGCGGGATG | AGCGAGGACG | AGCGTTGACA | AACGTCTGAC | 960 | |
| TGAGCAGGGC | AAGCAAGAGC | TCCGTGCTGC | GCGGCGGTGG | GAGGGAAGAG | CCGAGGGCGT | 1020 | 30 |
| GATTGGACGA | GGGAAGGAGT | CATCCAGACC | GCGTCTTCGG | CGAACTGGGC | GAAGAAGGCT | 1080 | |
| GGAAGAGCGA | CGAGGCTCGC | CGGCGCGCGC | GCACGCTGGG | CTGTATCGA | TTGATGGTCC | 1140 | |
| CTCGAGCAGC | GACGTTGGCC | GAGGCACTGT | CCTCGAAAGA | CTCAAATCGT | ACGGTGGGCC | 1200 | 35 |
| GGACATGGCC | TACCGGCGAC | CAATCCGCGA | TGGGCAAAATG | TCGGTCTCGT | TATCCACGCA | 1260 | |
| CGTTCTATCT | CGCCCGTTGG | CACGCCCAAG | GACGACTGCG | CTGCGACTGG | GCAGTCGTCT | 1320 | 40 |
| TGGGGGAAAA | CACTGCGAGG | TGCGCGGAAG | GGTGTGGAAG | GCCAAGGACG | AGCGGAGAAC | 1380 | |
| GGGCGGCGGC | GCGGGCCAGC | GAGCGCCCAA | AGCGGAAGGA | CAGCACAGGC | GCTGGGCGGG | 1440 | |
| TAGCGTCCGA | TCCATCTCAG | ATAAGAATCG | CCCCTGCGGT | ATATAACGCA | GACCTTGCGC | 1500 | 45 |
| CCCGACTGAA | CCCCATCCTC | TCATCCCATC | CACCACATCC | ACATGTCGGT | CAGTACCCGG | 1560 | |
| CTCACCCCTG | CAGTCCCTGC | ATGCGCTGAC | CTCTCCCTGC | AGCAACAAGT | CAACGTCGGA | 1620 | 50 |
| ATCAACGGGT | AAGATCGCTC | GCGGACTTGA | ATTACCGCA | TACATCCTAA | TCTCGCCCAA | 1680 | |
| TCCGCGTCTT | TTTCCAGTTT | CGGTGAGCCT | GCTCCCTCCC | TCGCTTTTAA | TCGCGCGCAT | 1740 | |
| ATACTCACCC | ATTGCGAGGT | CGTATCGGCC | GTATCGTCTT | CQGTAAATGCC | CTCCAGCACG | 1800 | 55 |
| GCAAGATCAA | TGTCGTCGCT | GTGAACGAGT | AAGCGCGCCC | AATCTGCATC | GCGTAAATCA | 1860 | |
| GACGCGCTCT | AACTCCCTGC | GCGCAGCCCT | TTCATCGACC | TTGAGTACAT | GGTCTACATG | 1920 | 60 |
| TTCAAGTACG | ACTCCGTCCA | CGGCCGCTTC | AAGGGCCACG | TCGAGGTCAA | GGACGGCAAG | 1980 | |
| CTCTGGGTCT | AGGGCAAGCC | CATCACCGTC | TTCCAGGAGA | AGGACGCCGC | CAACATTCCC | 2040 | |
| TGGGGCTCCG | CCGGCGCCGA | CTACATCGTC | GAGTCCACCG | GTGTCTTCAC | CACCACCGAA | 2100 | 65 |

DE 198 14 853 A 1

AAGTGGCGCAT ACACTCACCC AAACATGGCA TTTTGTAAGT GACGGGGTTC CCGATCGATA 2160
 GGGCCTCTGC CCACTTGAAG GGGGGTGGCA AGAAGGTCAT CATCTCCGCC CCTCCGGCG 2220
 ACGCGGCCAT GTTCGTCTGC GGTGTTAACC TGGACTCGTA CGACCCCAAG TACACTGTGG 2280
 TGGGTGCATT TTCCCATCGC GTGGGGCGAG AACCCCGATT TACCTCCGCC CGCGTGTAGA 2340
 TCCACTAGTG TCGACCTGCA GGGGGCGGAG CTCAGGTTT TGTTCCT 2387

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TCCAGCTCGA CCTTGGCGCG C 21

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGATCCGACG TGGAGGAGCC G 21

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

DE 198 14 853 A 1

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
(iii) HYPOTHETISCH: JA 5
(iii) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6: 10
TGGCAYGGNT TYTTYCA 17
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7: 15
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 14 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure 20
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS 25
(iii) HYPOTHETISCH: JA
(iii) ANTISENSE: NEIN 30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7: 35
TCDATRTGRC ARGG 14
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA: 40
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear 45
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
(iii) HYPOTHETISCH: JA 50
(iii) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8: 55
ATTCAGGGAT CCTGGTAYCA YWSNCAY 27
(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9: 60
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure 65

DE 198 14 853 A 1

(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

10 (iii) ANTISENSE: NEIN

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ATACGAGGAT CCRTGNCCT GNARRTG

27

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

20

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

30

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTISENSE: NEIN

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CGTATCGGCC GTATCGTCCT CCG

40

23

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

45

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

55

(iii) ANTISENSE: NEIN

60

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

CGCCCTTCAA GTGGCAGAG GCC

23

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

65

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
- (iii) HYPOTHETISCH: JA
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:
- AATTGCGGC CGC
- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:
- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
- (iii) HYPOTHETISCH: JA
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:
- AATTGCGGCC GCG

Patentansprüche

1. Expressionssystem für die Produktion eines Proteins in einem filamentösen Pilz bestehend aus
 - a) einem Wirtsorganismus aus der Klasse der Basidiomyceten sowie
 - b) einem DNS-Vektor, der ein Selektionsmarkergen enthält, welches für ein Protein kodiert das nach Transformation eines filamentösen Pilzes aus der Klasse der Basidiomyceten eine Selektion positiver Transformanten erlaubt und ausgewählt ist aus der Gruppe der Antibiotikaresistenzgene, die für Proteine kodieren, die die wachstumshemmende Wirkung von Antibiotika aufheben, gegen die der Wirtsorganismus nicht resistent ist, der Gene, die Proteine kodieren, die zu einer farbgebenden Reaktion befähigt sind und der Gene die einen genetischen Defekt des Wirtsorganismus (Auxotrophie) komplementieren, wobei die Expression des Selektionsmarkergens durch mindestens ein in Basidiomyceten aktives genetisches Regulationselement kontrolliert wird und
 - c) einem DNS Vektor der ein Gen enthält, welches für das zu produzierende Protein kodiert wobei die Expression dieses Gens und ggf. auch die Sekretion des so produzierten Proteins durch ein in Basidiomyceten aktives genetisches Regulationselement kontrolliert wird, wobei der DNS-Vektor, der ein Selektionsmarkergen enthält und der DNS-Vektor der das Gen welches für das zu produzierende Protein kodiert auch als ein DNS-Vektor vorliegen können.
2. Expressionssystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirtsorganismus aus der Klasse der Basidiomyceten ein monokaryontischer Basidiomycet ist.
3. Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirtsorganismus ausgewählt ist aus der Gruppe der Gattungen *Trametes*, *Polyporus* und *Coriolus*.
4. Expressionssystem nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirtsorganismus einen Defekt im Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylasegen (pyr G-Gen) hat und für Uridin auxotroph ist und das Selektionsmarkergen ein

pyr G-Gen ist.

5. Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das in Basidiomyceten aktive genetische Regulationselement aus der Klasse der Basidiomyceten ausgewählt ist aus der Gruppe der Promotor- und Terminatorelemente für ein Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenasegen (GAPDH Gen), und der Promotor- und Terminatorelemente für das Laccase Gene.

6. Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das zu exprimierende Protein eine Laccase ist.

7. DNS Vektor, der mindestens ein Selektionsmarkergen enthält, welches für ein Protein kodiert, das nach Transformation eines filamentösen Pilzes aus der Klasse der Basidiomyceten eine Selektion positiver Transformanten erlaubt, dadurch gekennzeichnet, daß das Selektionsmarkergen ausgewählt ist aus der Gruppe der Antibiotikaresistenzgene, die für Proteine kodieren, die die wachstumshemmende Wirkung von Antibiotika aufheben, gegen die der Wirtsorganismus nicht resistent ist, der Gene, die Proteine kodieren, die zu einer farbgebenden Reaktion befähigt sind und der Gene die einen genetischen Defekt des Wirtsorganismus (Auxotrophie) komplementieren und daß das Selektionsmarkergen durch mindestens ein in Basidiomyceten aktives genetisches Regulationselement kontrolliert wird.

8. In Basidiomyceten aktives Regulationselement, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es den in SEQ ID NO: 1 enthaltenen Sequenzabschnitt von Base 1-1192 oder den in SEQ ID NO: 2 enthaltenen Sequenzabschnitt von Base 1-547 oder den in SEQ ID NO: 3, enthaltenen Sequenzabschnitt von Base 1365-1542 sowie zu diesem Sequenzabschnitt homologe Sequenzen mit einer Homologie größer als 73% umfaßt.

9. Verfahren zur Herstellung von Pilzstämmen, die zur effizienten Expression und Sekretion von Proteinen befähigt sind dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtsstamm ein filamentöser Pilz aus der Klasse der Basidiomyceten mit einem auxotrophen Gendefekt verwendet wird, welcher mittels an sich bekannter Verfahren mit einem DNS-Vektor der ein Gen zur Komplementation des auxotrophen Gendefekts im Wirtsstamm besitzt, transformiert wird und aus dem Transformationsansatz die mit dem DNS-Vektor transformierten Klone durch Selektion auf Komplementation des auxotrophen Gendefekts ausgewählt werden, wobei die Expression des Gens zur Komplementation des auxotrophen Gendefekts im Wirtsstamm durch ein genetisches Regulationselement kontrolliert wird, das in Basidiomyceten aktiv ist.

10. Verfahren zur Herstellung von Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Expressionssystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 in an sich bekannter Weise zur Proteinproduktion eingesetzt wird oder daß ein Pilzstamm nach Anspruch 9 in an sich bekannter Art und Weise kultiviert wird.

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1:

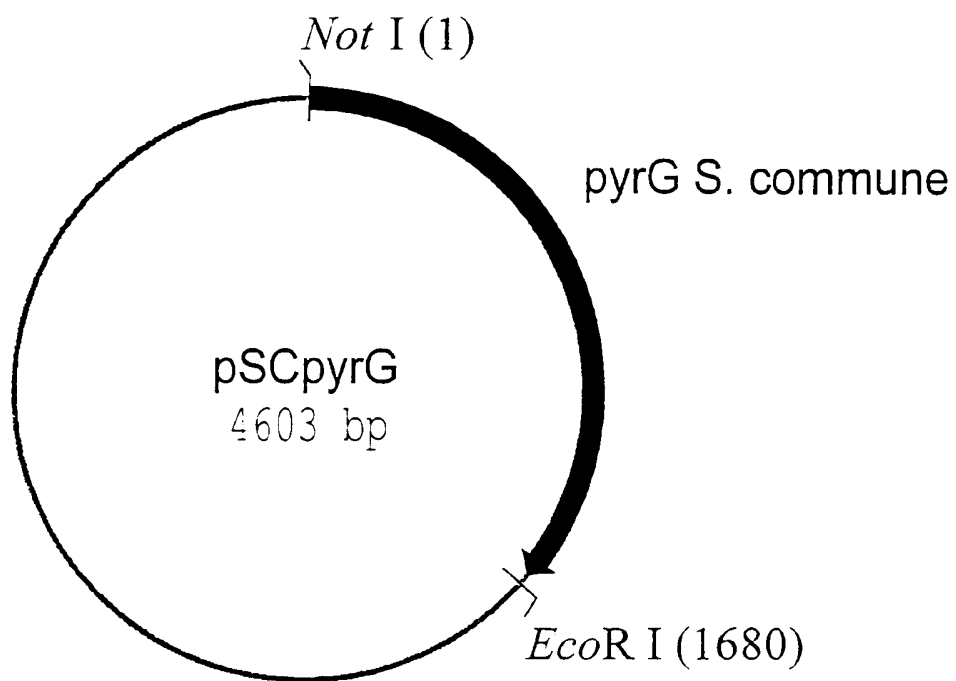


Fig. 2:

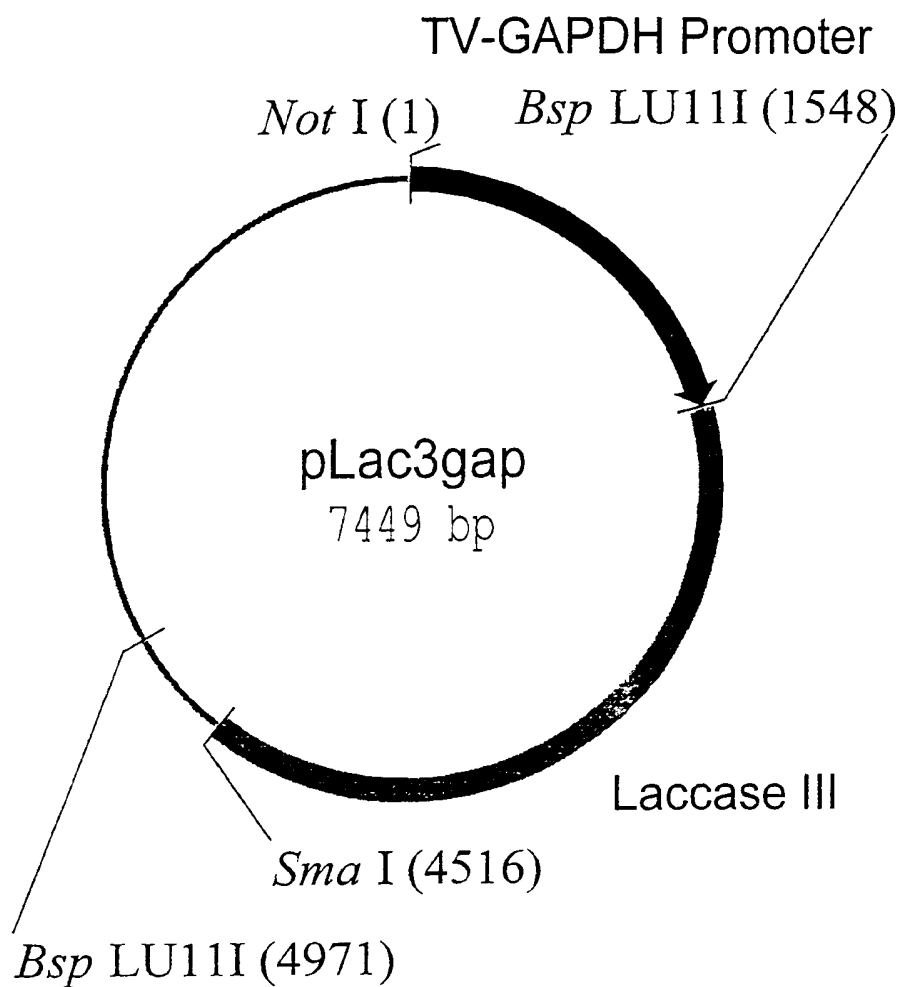


Fig. 3:

